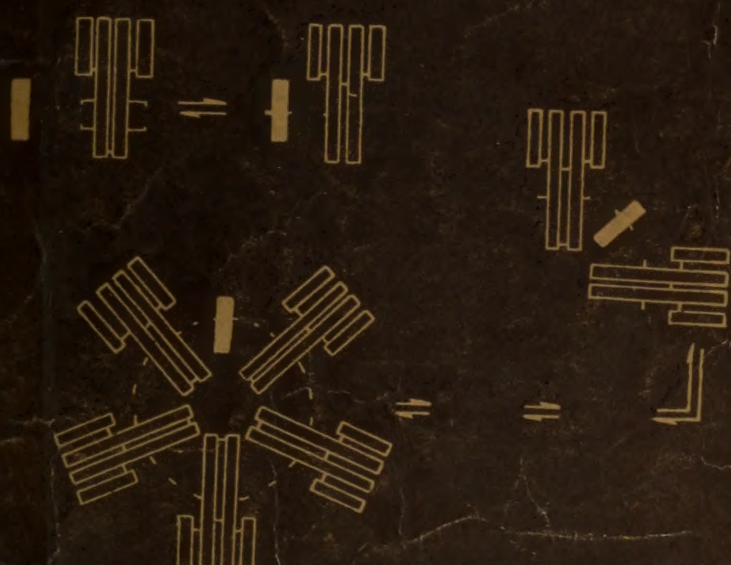
分子免疫学

王亚辉 著



科学出版社

分子免疫学

王亚辉 著

科学出版社

1982

23228

S0014690

中科院植物所图书馆

内 容 简 介

本书阐述免疫反应的分子基础。内容包括免疫原性和抗原专一性，抗体的结构和功能，抗原抗体的相互作用，抗体的合成，免疫球蛋白和有关分子的进化。本书还从分子细胞学水平论述了淋巴细胞在抗体合成中，信号、受体和基因的相互作用；各类淋巴球表面分子构造与免疫识别和免疫反应调节的关系；免疫反应的遗传控制；免疫球蛋白的基因结构及抗体多样性的起源等现代免疫生物学的基本问题。全书共分五篇十七章。

读者对象是免疫学、生物化学、分子生物学和医学工作者以及有关大专院校师生。

分 子 免 疫 学

王 亚 辉 著

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行　各地新华书店经售

*

1982年12月第一版　开本：787×1092　1/16

1982年12月第一次印刷　印张：34 1/2　插页：1

印数：0001—5,330　字数：809,000

统一书号：13031·2080

本社书号：2837·13—10

定价：5.40 元

23228

目　　录

绪论…… 1
第一篇　抗原：免疫原性和抗原专一性…… 10
第一章　人工抗原和天然抗原　蛋白质和多肽…… 11
第二章　多糖和含多糖的抗原及类脂物…… 71
第三章　核酸…… 90
第四章　细胞表面抗原…… 108
第五章　影响对抗原起反应的因素…… 157
第二篇　抗体：结构和功能…… 168
第六章　抗体的一般性质、分离和纯化…… 170
第七章　免疫球蛋白G的结构和功能…… 193
第八章　多聚体免疫球蛋白：Ig M 和 Ig A…… 224
第九章　反应素抗体：Ig E…… 249
第十章　抗原结合位点的结构…… 267
第三篇　抗原抗体的相互作用及补体…… 285
第十一章　抗原抗体的相互作用…… 286
第十二章　补体及其作用的分子基础…… 357
第四篇　抗体的合成——信号、受体和基因…… 398
第十三章　抗原和淋巴细胞的相互作用——抗体反应的触发机制…… 399
第十四章　免疫球蛋白的合成…… 434
第十五章　免疫球蛋白和免疫反应的遗传控制…… 470
第五篇　免疫球蛋白及有关分子的进化…… 511
第十六章　免疫球蛋白的进化…… 513
第十七章　补体及其它与免疫球蛋白有关分子的进化…… 535
补注一
补注二

绪 论

免疫性是动物在长期进化过程中逐渐发展起来的防御感染和维护机体完整性的十分有效而灵巧的手段。免疫系统的特殊功能是识别“自我”和“非自我”的物质。对自身的物质不起反应，而对外源的及体内改变了的物质则能起专一的免疫反应，排除其对机体的危害。另一方面，免疫系统还担负着维持机体免疫状态的自身稳定性，以清除体内衰老和突变的细胞。机体的这种免疫功能又是在神经体液系统的调节下，通过细胞和体液因素之间，以及细胞彼此之间，相互协作和相互制约而维持常态的。免疫功能的失调则是造成自身免疫病和某些肿瘤发生的重要条件。因此，免疫学的主要任务是认识和利用免疫系统的这种对立统一的特殊规律，定向地控制免疫反应和调节免疫功能，以维护机体的健康和完整性。

一、免疫学的基本概念

（一）免疫反应的细胞学基础

免疫反应的细胞学基础是淋巴样系统，主要是小淋巴细胞。小淋巴细胞能专一地识别抗原，并起反应，所以也称为免疫活性细胞（Immunological competent cells）或抗原敏感细胞（Antigen sensitive cells）。在受到抗原刺激后，一类小淋巴细胞（依赖胸腺的 T 细胞）便增生、分化，直接参与攻击靶细胞或间接地释放一些生物活性因子（迁移抑制因子、发炎因子、转移因子、淋巴毒素、促分裂因子等），所起的免疫作用称为细胞免疫。

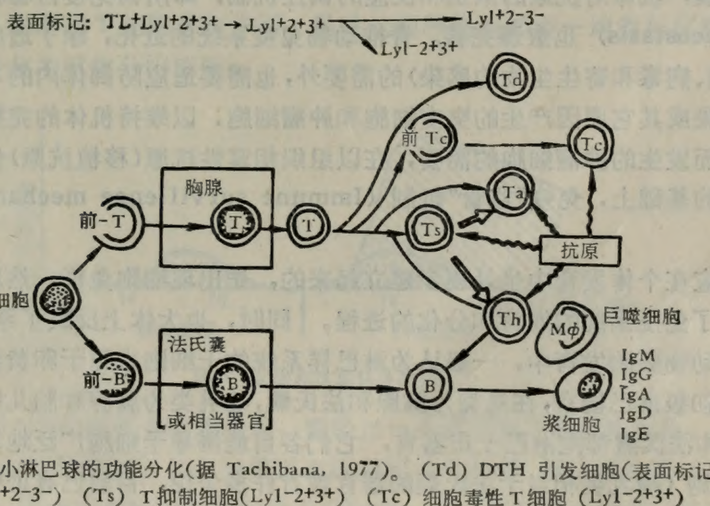


图1 小淋巴球的功能分化（据 Tachibana，1977）。（Td）DTH 引发细胞（表面标记 $Ly1^{+}2^{-}3^{-}$）（Ts）T 抑制细胞（$Ly1^{-}2^{+}3^{+}$）（Tc）细胞毒性 T 细胞（$Ly1^{-}2^{+}3^{+}$）（Th）辅助 T 细胞（$Ly1^{+}2^{-}3^{-}$）（Ta）扩大 T 细胞（$Ly1^{+}2^{-}3^{-}$）。

另一类小淋巴细胞(来源于骨髓的B细胞)则增生、分化为浆细胞,合成抗体(各类免疫球蛋白,包括Ig M,Ig G,Ig A,Ig E 等),释放到体液中起作用,称为体液免疫。对于大多数抗原(胸腺依赖抗原),B细胞的抗体反应还需要T细胞("辅助"细胞 Helper cells)及巨噬细胞的协同作用。此外,免疫反应还受T抑制细胞(Tsuppressor cells)的调节。因此,有人认为T细胞(各亚群)是调节细胞,在免疫反应的调节中起关键作用(图1)。两类小淋巴球及其亚群,在细胞形态上看不出差异,只能从功能上和细胞表面标记加以区别。

无论细胞免疫或体液免疫,其最重要的特征是对抗原或靶细胞有高度的专一性。目前已经明了这是由于淋巴细胞表面存在专一的抗原受体(在B细胞是免疫球蛋白)能非常精确地识别抗原的缘故。

(二)免疫系统的系统发生和个体发生

无论在系统发生或个体发生中,免疫反应都是随淋巴样系统的发育而逐步建立和完善起来的。现已证明现存脊椎动物的最原始的代表(如圆口类的一种盲鳗)已具有专一的细胞免疫能力和初步的体液免疫能力。细胞免疫性表现为能加速排斥再次移植的皮肤植片。这种表现为移植免疫的细胞免疫在进化上是比体液免疫更为古老的防御机制,可以追溯到无脊椎动物(如环节动物)。但是,迄今所知,没有任何无脊椎动物能合成专一的抗体。虽然所有脊椎动物都能产生专一的抗体,但是免疫系统(淋巴样系统)和抗体反应(能识别的抗原的种类、抗体的种类和免疫记忆)都还经历过一个不断完善和复杂化的过程。随着淋巴样系统的完善,体温的恒定,到鸟类和哺乳类免疫性才得到高度发展。哺乳类,尤其是灵长类,中枢神经系统高度发展,高级神经活动在维持有机体和环境的统一以及体内环境的恒定中占有支配地位。有机体的免疫反应同样受到神经体液系统(下丘脑一垂体一肾上腺皮质系统)的调节控制。在神经体液系统的调节下,随着免疫活性细胞的类别和亚群在功能上的分化,细胞之间,细胞因素和体液因素之间的相互作用,尤其是T细胞调节作用的发展,机体对抗原的识别和反应的调控机制,即所谓免疫自稳机制(Immunological homeostasis)也愈臻完善。脊椎动物免疫系统的进化,除了适应防御外来的不利因素(细菌、病毒和寄生生物的感染)的需要外,也需要适应防御体内的不利因素,消除由于病毒感染或其它原因产生的突变细胞和肿瘤细胞,以维持机体的完整性。由于防御体细胞突变而发生的肿瘤细胞的需要,在以组织相容性抗原(移植抗原)作为主要靶抗原的细胞免疫的基础上,免疫"监管"机制(Immune survillence mechanism)也发展起来了。

免疫反应在个体发育中也是逐步建立起来的,先出现细胞免疫,然后再出现体液免疫。这反映了免疫系统的发育和分化的进程。同时,也大体上反映了系统发生的进程。在高等脊椎动物胚胎发育中,一般认为淋巴样系统的干细胞来源于卵黄囊。这些细胞随血流散播到初级淋巴器官,在鸟类为胸腺和法氏囊,哺乳类为胸腺和胎儿肝脏(继之为骨髓)。胸腺和法氏囊都是淋巴上皮器官,它们各自能诱导干细胞广泛地增生并分化为T细胞和B细胞(哺乳类相当于法氏囊的器官曾有许多争论,目前已有证据表明可能是胎儿肝脏)(图2)。T细胞和B细胞在外表形态上没有区别。然而在细胞来源上、功能上

和细胞表面特性上却有非常明显的不同。它们来源于不同的初级淋巴器官；分布在次级淋巴器官(脾脏、淋巴结、肠淋巴组织等)的不同部位(T 细胞位于淋巴结的副皮质和脾脏之中央小动脉周围区域，即依赖胸腺区)；介导不同类型的免疫反应；并且具有不同的表面受体和标记。两类淋巴细胞及其亚群的功能，在免疫系统的分化和免疫反应中的相互作用以及表面特性是目前细胞免疫学仍在热烈研究的问题。

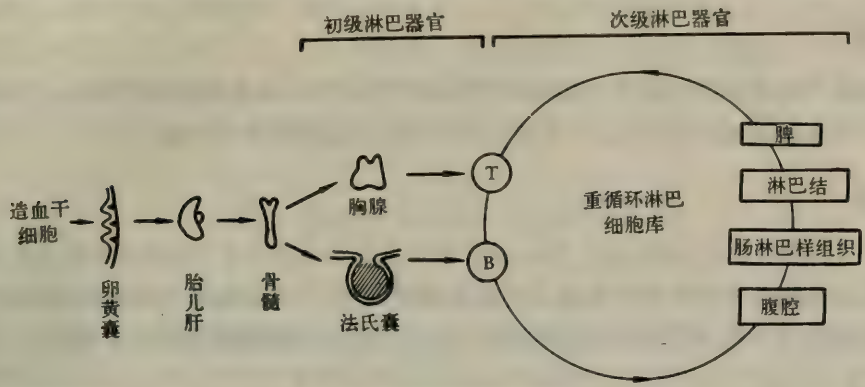


图 2 淋巴细胞的来源和分化。

(三) 免疫反应的进程

免疫反应是通过许多种细胞之间的相互作用而完成的，其关键在于淋巴细胞表面抗原受体对抗原的专一的识别作用。T 细胞和 B 细胞表面都有专一的抗原受体能选择地识别抗原，但是它们担任着不同的免疫功能。T 细胞的主要功能是识别组织相容性抗原(移植抗原)和对免疫反应的调节和“监管”。T 细胞又分为许多亚群，分担这些不同的功能，其中一个亚群是介导细胞免疫反应的(如移植物的排斥和迟发型超敏反应等)，另一些亚群则起调节作用(如“辅助”T 细胞、抑制 T 细胞等)。B 细胞是产生抗体的前身细胞，在受到抗原刺激后，就增生、分化为能合成和分泌抗体的浆细胞。对于大多数抗原，抗体反应同时需要 B 细胞和 T 细胞参与作用。虽然这两种细胞都专一地参与抗原的识别，但只有 B 细胞才分化为抗体分泌细胞。

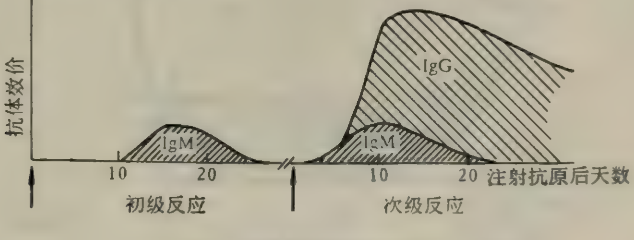


图 3 初级和次级抗体反应。

动物在受到一个抗原的初次刺激后，要经过一个迟滞期才能产生抗体，并且抗体的类别是 Ig M，称为初级抗体反应。如果再次注射同一个抗原，抗体便立即迅速增高，并且主要是 Ig G，呈现次级抗体反应的特点(图 3)。这一现象称为免疫记忆(Immuno-

logical memory)。其发生的原因是由于在初级反应时，接受过抗原刺激的一部分小淋巴细胞转化为记忆细胞（Memory cells）保存下来。当这些细胞再次受到同一抗原刺激时，它们便迅速增生、分化，并产生大量抗体。免疫记忆是淋巴细胞的重要特性。

动物接受抗原刺激后的免疫反应进程，可以设想分为三个时期，初始期、中央期和效应期。各时期的关系和特点分述如下(图 4)：

1. 初始期

主要是抗原和小淋巴球表面的抗原受体专一地结合，从而激活这些细胞。这一时期还包括巨噬细胞吞噬和处理抗原，并把处理过的抗原提供给淋巴细胞。

2. 中央期

包括 T，B 细胞（巨噬细胞）间的相互作用以及同体液因子（抗体等）的相互作用，其结果决定免疫反应的类型（抗体反应或免疫耐受性），并引起淋巴细胞的增生和分化，产生对抗原起专一反应的回忆细胞和效应细胞（抗体分泌细胞或致敏的 T 细胞）。

3. 效应期

这一时期不再依赖抗原的作用。在上一时期受到抗原专一的刺激而增生的 B 细胞的

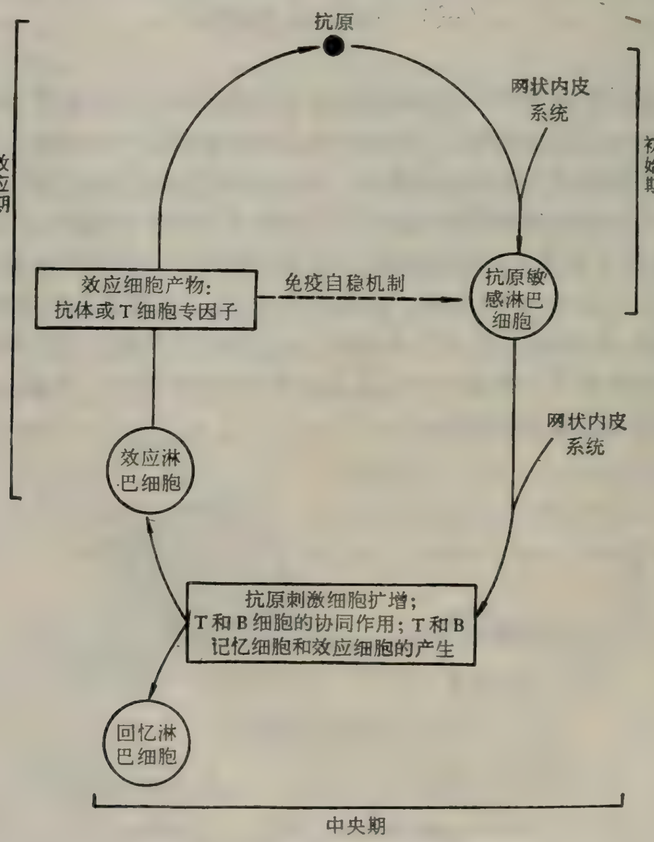


图 4　免疫反应进程的三个时期。

后裔，分化成浆细胞，合成和分泌抗体。这些专一的抗体对抗原(靶细胞)的作用还需要血清中一类称为补体的因子参加。补体能被与细胞表面结合的抗原抗体复合物激活，产生溶细胞作用。此外，补体激活过程中产生的中间产物，还能吸引和激活白血球，引起炎症反应，扩大专一抗体的效应。另一方面，致敏的T效应细胞除去直接攻击靶细胞外，还能产生多种可溶性因子(包括迁移抑制因子，促分裂因子，转移因子，淋巴毒素，化学吸引因子等)，总称为淋巴激动素（Lymphokines），作用于巨噬细胞、白血球等其他细胞，扩大细胞介导免疫的效应。分子水平的抗原抗体反应，通过免疫效应系统(补体，淋巴激动素和白血球等)的放大，始呈现为各种宏观的免疫现象。对抗原反应的专一性，记忆和效应的放大是脊椎动物的免疫反应的主要特点。

（四）免疫反应的调节和遗传控制

对于同一抗原，不同物种或品系的动物，甚至同一品系的不同个体的免疫反应可能是不同的。动物对一个抗原以何种方式起反应，一方面是受遗传基础决定的，另一方面还受体液和细胞因素之间的复杂的相互作用的制约。抗原本身的质和量在免疫反应的调节中也起重要的作用。

1. 免疫反应的调节

由于抗原是发动淋巴球增生和分化的专一因素，抗原的有效浓度也就是免疫反应的一个主要的调节因素。当抗原在体内被酶降解，或被产生的抗体中和(封阻)时，随着抗原浓度的下降，维持免疫反应的能力也就逐渐减弱。抗原和抗体之间存在的这种反馈机制，限制了抗体的过量产生。

T细胞在免疫反应的调节中占据着中心位置。除去T辅助细胞能加强B细胞的抗

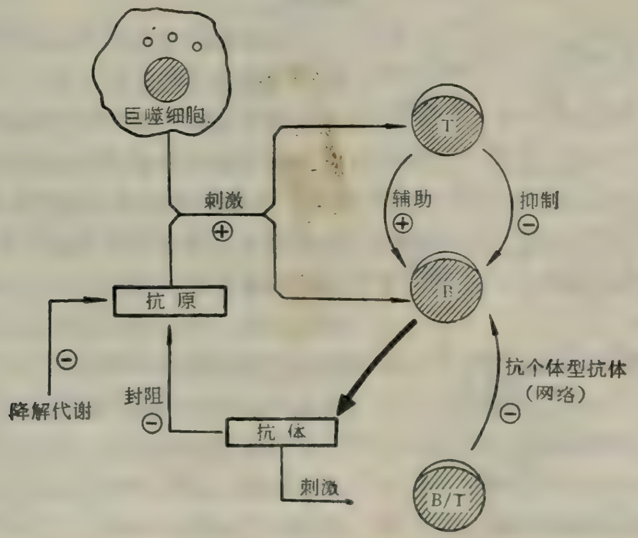


图5 免疫反应的调节。

体反应外，有许多证据表明还存在一个起抑制作用的亚群，T抑制细胞。例如，小鼠注射大量羊红血球造成无免疫反应性。将这种动物的T细胞转移到正常小鼠时，就能抑制专一的抗体的形成。将年青的新西兰小黑鼠(NZB)的胸腺细胞注射到年老患病的小黑鼠，能抑制自身抗体的产生。此外，T细胞又可能被其他T细胞或B细胞抑制。

每一个抗体的抗原结合位点都存在专一的决定簇(个体型决定簇)。一个抗体的个体型决定簇可能引起抗抗体，抑制该抗体的产生。而抗抗体的个体型决定簇又可能引起抗抗抗体。如此反复作用，产生多重的抗体和抗抗体，构成一个复杂的网络，控制着淋巴球的扩增和抗体的产生(Jerne，1973)。

免疫反应调节中细胞因素和体液因素相互制约的复杂关系可用简图表示(图5)。

2. 免疫反应的遗传控制

免疫反应受到非专一的和专一的遗传因子的控制。Biozzi 等(1972)在小鼠上进行选择交配实验，选育出对许多种抗原的抗体反应高低不同的两个品系。这两个品系的小鼠的巨噬细胞"处理"抗原的能力不同。反应能力高的品系的巨噬细胞表面能保持较多的完整的抗原分子，从而保持较大的免疫原性。

对专一抗原的免疫反应受到两类基因的控制，一类是同免疫球蛋白基因连锁的，另一类是同主组织相容性基因复合物(MHC)连锁的。

在一些情形下，如用C型链球菌免疫家兔时，能产生均一的抗体(单株抗体)。遗传分析证明产生单株抗体的能力及这种抗体的个体型专一性是同该免疫球蛋白 C 区的遗传标记连锁的。这就是说在带有抗体的C基因的同一条染色体上也可能存在编码抗体V区的基因。

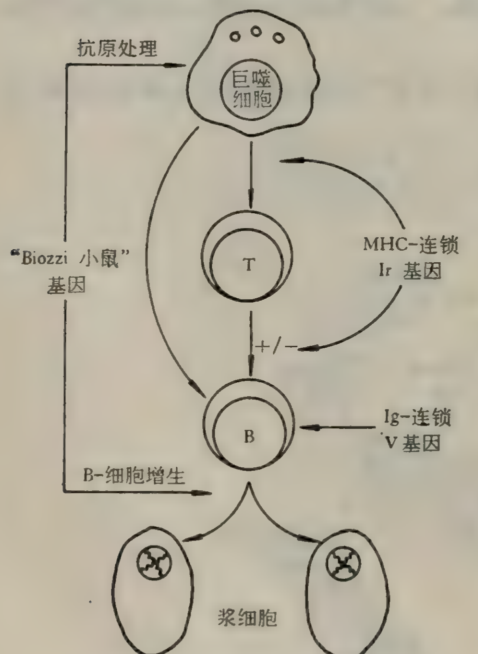


图6 免疫反应的遗传控制。

高等脊椎动物和异体组织排斥有关的移植抗原主要是受染色体上的一个称为主组织相容性基因复合物(MHC)的基因座控制的。有人发现对许多种胸腺依赖抗原的免疫反应是受同MHC连锁的基因专一地控制的。这一类专一的免疫反应基因(Ir 基因)不影响B细胞对非胸腺依赖抗原的反应，但能影响对胸腺依赖抗原的反应。它们可能是通过控制B细胞、T细胞和巨噬细胞产生同细胞相互作用有关的、带有Ia抗原专一性的因子而起作用的。

简言之，和Ig连锁的免疫反应基因是控制B细胞的，而和MHC连锁的免疫反应基因则是控制T细胞、B细胞和巨噬细胞的相互作用因子的(图6)。

（五）免疫反应的方式

成体动物对抗原的反应有多种方式，诱导抗体形成（IgM，IgG，IgA 或 IgE）、细胞免疫或免疫耐受性。正常情形下，机体对病源微生物或其他不利因素发生免疫反应（循环抗体或细胞免疫），对抗感染或中和抗原，起着有利的保护作用。然而，在一些特殊条件下，机体对抗原（或能与抗原结合的简单分子）的反应性增高而造成有害影响。这种由抗原专一地引起的免疫反应性的改变（通常表现为反应性的增高）称为变态反应（Allergy）或超敏反应（Hypersensitivity）。如某些敏感的人对花粉、含有螨分泌物的尘屑引起的哮喘，对盘尼西林等药物的过敏等。

超敏反应按其发病潜伏时间的长短和免疫学机制的不同，又可分为速发型超敏反应（Immediate hypersensitivity）和迟发型超敏反应（Delayed hypersensitivity）两大类。简单说来，前者依赖循环抗体，可经血清被动传递；主要作用于平滑肌和血管，几分钟内就能呈现反应。如临床上常见的对药物的过敏性休克便属于这一类型。后者主要是由于致敏的 T 细胞对靶细胞作用的结果，可通过淋巴球传递；呈现反应的潜伏时间长，约需 1—3 天或更长时间。如对结核菌素的反应属于这一类型(图 7)。

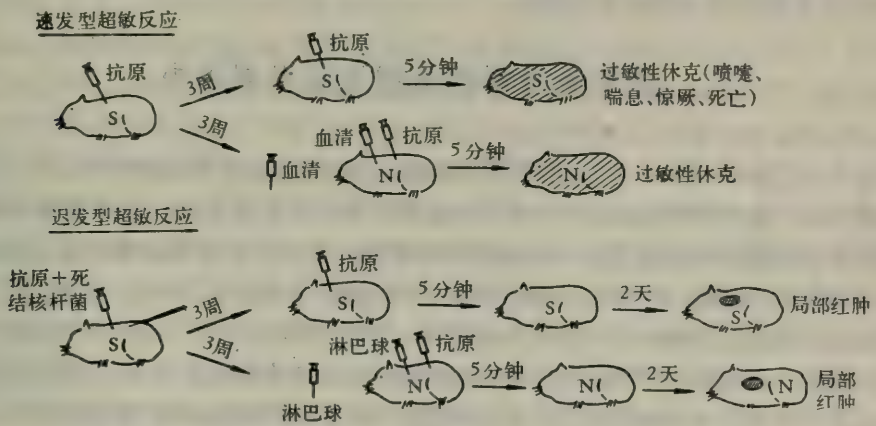


图 7　速发型和迟发型超敏反应的区别。S 为致敏动物；N 为未致敏动物。

在动物胚胎期或初生期引入组织抗原或可溶性抗原，将来移植同一施主的组织或注射同一抗原，则不起免疫反应，而移植或注射其他组织或抗原时仍能起反应(图 8)。对事先接触过的抗原能专一地不起免疫反应的现象，称为获得免疫耐受性（Acquired immunological tolerance）。成体动物在特定条件下，某些可溶性抗原也可以引起免疫耐受性。

正常情形下，机体不对"自我"的组织抗原起免疫反应。如果机体的免疫自稳机制失调，或者自身组织抗原发生了某种改变，当这些抗原进入体液环境后，便可能被免疫活性细胞误认为"非自我"的抗原，这些受到抗原刺激的细胞或引起的抗体就会对相应的自身组织起反应，造成免疫损伤，引起自身免疫病（Autoimmune diesease）。过去许多原因不明的疑难病症，如类风湿性关节炎，某些肾小球肾炎、红斑狼疮等在发病机制上都属于自身免疫病。

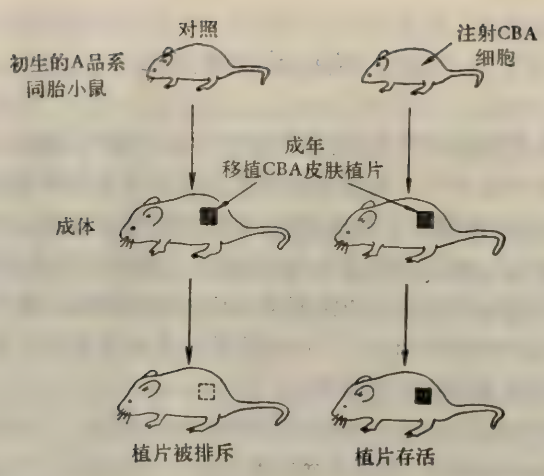


图 8　免疫耐受性的诱导。A 品系初生期小鼠注射 CBA 小鼠细胞后对 CBA 皮肤植片产生耐受性。

由上述可见，在进化过程中形成的免疫防御机制对动物体的作用是"一分为二的"。免疫反应在对抗感染，消除突变细胞——肿瘤免疫等方面，对机体是有利的；而在引起变态反应、自身免疫病等方面又是有害的。

二、分子免疫学的范围及其发展简史

从五十年代末期 Burnet 提出获得性免疫的无性细胞繁殖系选择学说以来，免疫学无论在研究的广度和深度方面，都取得了迅速的扩大和深入的进展。由于医学实践的推动及受到分子生物学和细胞生物学蓬勃发展的影响，近十多年来免疫学研究远远超出了过去微生物免疫的范围，扩大到了移植免疫、肿瘤免疫、生殖免疫、寄生虫免疫，以及细胞分化、遗传和进化等广阔的医学和生物学领域，汇集这些在分子和细胞水平的研究形成了免疫生物学。在细胞水平的研究方面，胸腺和小淋巴球功能的发现，两类淋巴球功能上的分工及它们在抗体形成中的协同作用的阐明，开辟了细胞免疫学的"黄金时代"。同时，对免疫反应的分子基础的研究也取得了重大的进展，形成了分子免疫学。

分子免疫学是从免疫化学发展而来的，是现代免疫学的一个新分支。免疫化学主要研究抗原和抗体及其相互作用，范围原来仅限于体液免疫方面。

抗体是免疫反应的关键分子，具有识别抗原和发生效应（固定补体、结合细胞等）两类功能。抗原抗体反应的最显著特点是高度专一性。抗体分子如何识别成千上万结构不同的抗原，如何完成对抗原或靶细胞的效应功能？抗体分子的结构和功能的关系，以及和抗原结合专一性的结构基础，抗原抗体反应的机制等，曾经是免疫化学研究的中心课题。

从上世纪末 Emil von Behring 发现抗体以来，抗体的研究经历了几个主要的发展阶段。P. Ehrlich (1906) 采用"锁和钥"的假说来解释免疫反应，设想抗体和对应的抗原之间的结合专一性，依赖于这两种分子表面构造的互补性。抗原抗体分子结构互补的思想，对于抗体问题的研究有深远的影响。其次，K. Landsteiner (1917) 对已知化学构造的人工半抗原的研究，阐明了抗体能识别分子构造的微小差异，并且证明对于各种

各样的抗原,机体都能相应地产生专一的抗体。三十年代末，自由电泳技术建立后不久,就证明抗体是血清丙种球蛋白(免疫球蛋白)。然而,关于抗体的性质、结构和生物合成的知识,主要是在最近十多年内积累起来的。

五十年代末期，N. Jerne 和 M. Burnet 提出获得免疫性的无性细胞系选择学说,主张抗原有选择地和免疫活性细胞表面的抗原受体结合,并刺激它增生、分化成为一群浆细胞,产生结合专一性相同的抗体。 抗原选择预先存在的细胞，而不是象 L. Pauling 曾经假定的那样，作为一个模板来塑造抗体。这一学说推动了抗体研究和整个免疫学的飞跃发展。

六十年代初期起，R. R. Porter 和 G. M. Edelman 对抗体分子的两条肽链(重链和轻链)及其酶解片段的结构分析,阐明了抗体分子的一般结构原理。Edelman(1969)首先完成了一种人类免疫球蛋白 (IgG_1) 全部一级结构的测定，并在一级结构的比较研究基础上，提出功能区学说来解释抗体分子的功能分化以及遗传和进化等一般生物学问题。于是,便开创了免疫化学发展的新时期——分子免疫学。此后,分子免疫学发展十分迅速。已经先后大体上弄清楚了各类免疫球蛋白(包括 IgG，IgM，IgA，IgE) 的一级结构和一些免疫球蛋白的立体结构，抗原结合位点的构造，以及抗体生物合成的全过程等问题。在抗原研究方面，阐明了一种球蛋白(肌红蛋白)的全部抗原结构，对抗原的免疫原性和抗原专一性结构基础已有深入的认识；核酸的抗原性得到证实；细胞表面抗原(血型抗原、组织相容性抗原、肿瘤相关抗原等)的研究也有很大进展。尤其引人注目的是,抗原的改造和人工合成抗原的研究,为人工合成高效和广谱的疫苗开辟了广阔的前景。

另一方面,细胞免疫学的蓬勃发展,也为分子免疫学提供了许多新概念和新问题。从七十年代起,分子免疫学加强了和细胞免疫学的相互渗透,研究领域已超出了体液免疫范围,并深入到对淋巴细胞的研究。当前发展的新趋向是以淋巴细胞为中心,从分子水平研究淋巴细胞对抗原的识别、激活和效应放大的机制,而核心问题又是淋巴细胞的分化和激活过程中，信号、受体和基因表达问题。最近,应用遗传工程技术分析免疫球蛋白基因的结构取得了重要进展。抗体多样性起源的遗传控制问题，已从理论上的探讨进入到实验验证阶段。总之,分子免疫学正在和细胞免疫学融合起来,对淋巴细胞的识别机制、抗体合成、抗体多样性起源的遗传控制和分子进化等基本生物学问题,进行深入研究。目前新的现象不断发现，新的领域不断开拓。这些方面的研究必然会促进对于细胞的一般识别机制,真核细胞的基因表达,生物大分子合成的遗传控制等基本生物学问题的进步。同时,分子免疫学这些基本理论研究成果也必然会加深对移植免疫、肿瘤免疫、变态反应和自身免疫病等重大医学问题的认识，并促进其解决。

参　考　资　料

Burnet, F. M. (1969). Self and not-self. Cellular Immunology, Melbourne and Cambridge University Press.

Hobart, M. J. and McConnell, I. (1975). The Immune System: a course on the molecular and cellular basis of immunity, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Jerne, N. K. (1973). The Immune System (Network theory), *Scientific American*, 229. 52.

Roitt, I. M. (1977). Essential Immunology, 3rd edition Blackwell Scientific Publications, Oxford.

第一篇　抗原：免疫原性和抗原专一性

根据 Landsteiner (1945) 的定义，抗原是能在动物体内引起抗体的产生，并能和抗体起反应的物质。对于同一抗原，不同的物种，甚至同种不同的个体，引起的免疫反应也可能不同。免疫反应不只是决定于抗原的化学构造，还决定于个体的反应能力(遗传性和生理状态)。引入抗原途径、剂量和佐剂的应用也有很大的影响。因此，近来常用免疫原性(Immunogenicity) 这个概念来概括抗原对有反应能力的个体引起免疫反应的能力，而用抗原专一性 (Antigenic specificity) 来表示抗原和抗体起反应的能力。相应地，一个抗原，就其诱发免疫反应的能力来说，又可称为免疫原 (Immunogen)。一个免疫原的免疫原性实际上涉及所引起的免疫反应的类型(体液抗体、细胞免疫或免疫耐受性)、抗体的种类以及反应强度等方面。免疫反应的主要特点是抗原抗体反应的高度专一性。这种专一性是基于抗原的化学结构，即整个抗原分子的空间构象以及局部某些基团(抗原决定簇 Antigenic determinants)的特性。总之，抗原的免疫学功能即抗原性(Antigenicity)包括两个方面：即免疫原性和抗原专一性。免疫原性是引起免疫反应的能力，而与形成的抗体的专一性是不同的概念。抗原专一性是抗体的结合位点性质的反映，是由抗原分子，或其一小部分和已形成的抗体反应的能力确定的。不过，有时也用抗原性来泛指抗原和抗体的反应能力。

免疫学早期研究中，常用的大多数抗原是颗粒性抗原，如病毒、细菌、红血球等；也有一些可溶性抗原，如细菌和动植物的毒素。后来发现其中有免疫原性的成分主要是蛋白质或复合蛋白质(糖蛋白、脂蛋白、或糖脂蛋白)，也有一些为多糖。近来还证实核酸也有免疫原性。脂类本身并无免疫原性，但能和相应的抗体起专一的反应。能和抗体起反应，但不能引起免疫反应的简单分子称为半抗原 (Hapten)。天然抗原几乎都是大分子、含有许多个抗原决定簇，构造复杂，难于分析研究。用已知化学构造的简单分子(半抗原)和蛋白质载体 (Carrier) 或人工合成的多聚氨基酸结合做成的人工抗原，对抗原专一性和免疫原性之分子基础的分析研究，曾经起过很大的推动作用。

本篇主要讨论对于正常成体动物，人工和天然抗原(蛋白质、多糖、核酸等)的化学结构和物理性质与其免疫原性和抗原专一性的关系，即免疫原性和抗原专一性的分子基础。然后再简略地谈一些影响机体对抗原反应的因素，如佐剂作用原理、动物遗传性和反应能力等方面的问题。细胞表面抗原涉及血型、移植免疫和肿瘤免疫等方面的问题，近年来受到很大注意，也将专列一章讨论。

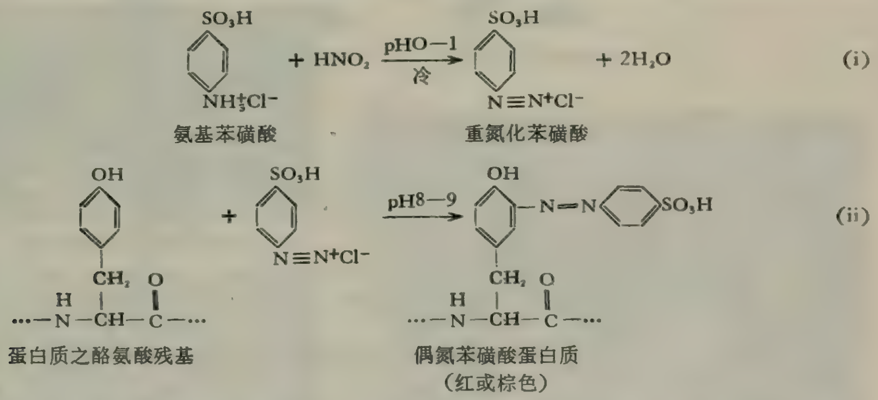
第一章　人工抗原和天然抗原　蛋白质和多肽

一、人 工 抗 原

抗原抗体反应最显著的特点是作用的高度专一性。抗原专一性的分子基础是什么？由于天然蛋白质结构的复杂性，有多个决定簇，难于分析。这方面的知识最先是靠 Landsteiner 创始的在抗原蛋白质上连结已知结构的简单分子的实验得到的（Landsteiner, 1945）。

（一）人工结合蛋白质的专一性

Landsteiner（1917）把一个预备作为决定簇的简单分子连接到芳香族胺类，如苯胺分子上，然后重氮化，再通过酪氨酸残基与蛋白质结合，形成的产物称为结合蛋白质（Conjugated protein），或偶氮蛋白质（Azoprotein）。



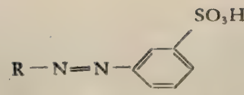
这样用人工方法结合到蛋白质上的简单分子起着半抗原的作用，与之结合的蛋白质分子，称为载体蛋白质（Carrier protein）。为了研究半抗原的免疫学专一性和其化学结构的关系，并避免载体蛋白质的干扰，Landsteiner 建立了一种免疫学测定法：将马血清白蛋白的偶氮衍生物作为抗原注射到家兔得到抗血清。然后用与同一偶氮衍生物结合的鸡血清白蛋白作为测定抗原，和家兔抗血清作沉淀反应。由此避免了和马血清白蛋白的交叉反应。利用这样的实验系统证明抗半抗原抗体具有高度的免疫学专一性。

1. 半抗原专一性

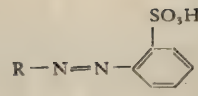
Landsteiner 在最初的一系列实验里用这样的方法证明，氨基苯磺酸的三个同分异构物，当重氮化后和蛋白质结合时，在血清学上能够互相区别：



对位-偶氮氨基苯磺酸



间位-偶氮氨基苯磺酸



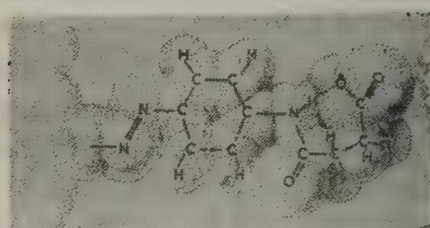
邻位-偶氮氨基苯磺酸

利用类似方法几乎可以把任何所需基团连结到蛋白质分子上。例如，可把酒石酸的光学异构物（d-，l-）分别和对硝基苯胺缩合，经重氮化再连接到蛋白质载体上，以研究其免疫学专一性，结果证明 d-，和 l- 酒石酸可以在血清学上区分开来(表 1-1)。

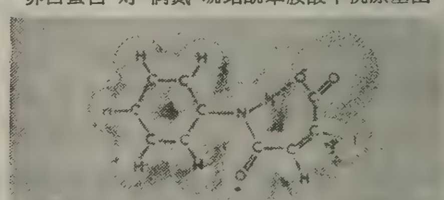
表 1-1　决定簇的旋光异构对偶氮蛋白质抗原专一性的影响

	抗原：含下列半抗原		
	l-酒石酸	d-酒石酸	m-酒石酸（分子内消旋）
为含下列物质的偶氮蛋白质的抗血清沉淀：	COOH | HOCH | HCOH | COOH	COOH | HCOH | HOCH | COOH	COOH | HCOH | HCOH | COOH
l-酒石酸	++±	O	±
d-酒石酸	O	++±	±
m-酒石酸	±	O	+++

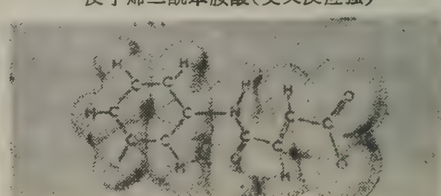




卵白蛋白-对-偶氮-琥珀酰苯胺酸半抗原基团



反丁烯二酰苯胺酸(交叉反应强)



顺丁烯二酰苯胺酸(交叉反应很弱)

图 1-1　对-偶氮琥珀酰苯胺酸的抗半抗原抗体分子结合位点以及半抗原基团简图。分子外形上相似的半抗原(反丁烯二酰苯胺酸)和抗体有很强的交叉反应，另一半抗原(顺丁烯二酰苯胺酸)只有很弱的交叉反应。这清楚地表示了半抗原基团和结合位点在空间互补上的密合程度的重要(据 Pauling, 1948)。

同样地，对顺式和反式异构物也能区别。如卵白蛋白-对-偶氮琥珀酰苯胺酸之抗半抗原抗体，和偶氮反丁烯二酰苯胺酸半抗原有很强的交叉反应，而和偶氮顺丁烯二酰苯胺酸半抗原只有很弱的交叉反应(图 1-1)。这清楚地表明交叉反应的程度是由半抗原决定簇和抗体结合位点之间空间互补的密合程度决定的。

研究半抗原化学结构和免疫学专一性的关系的另一种方法是利用半抗原和抗原竞争抗体的结合位点，从而抑制抗原和抗体的沉淀反应。例如各种低分子量的 P-苯砷酸衍生物能竞争性抑制具有 P-偶氮苯砷酸衍生物决定簇的结合蛋白质和其抗体的反应（图 1-2)。这清楚地证明抗体分子只和抗原表面的一定化学基团起反应，而不是和整个大分子表面起反应。抗原抗体结合位点可能不超过 10—15 Å 大小。

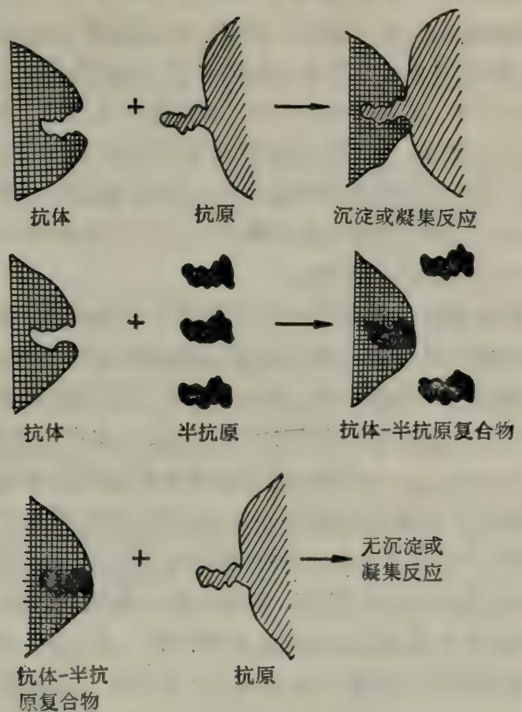
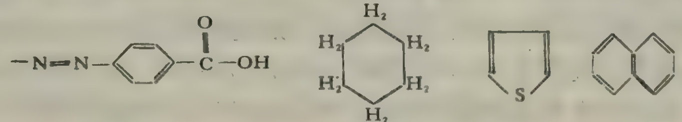


图 1-2　示半抗原抑制抗体抗原反应的原理(据 Boyd, 1962)。

决定簇的形状和稳固性与其免疫学专一性有密切的关系。如前述，光学异构物可以互相区别，而烃链长短对专一性影响就很小，这是因为烃链在溶液中没有稳固的构象。含对-偶氮苯甲酸的结合蛋白质也可以和含环己烷、噻吩、萘的偶氮蛋白质起交叉反应。



偶氮苯甲酸　　环己烷　　噻吩　　萘

所有这些实验表明，抗原（偶氮结合蛋白质）的免疫学专一性主要依赖于分子表面决定簇的形状和稳固性。此外，增加半抗原的极性基团可以增强免疫原性。

用以上方法还可以在一个蛋白质载体分子上结合两个半抗原。免疫时可以引起两种

抗体,每一种抗体只能与一种半抗原结合。例如羊血清球蛋白先与偶氮砷酸结合,然后再碘化。这种结合抗原可引起两种不同的抗体。其中一种可以被碘化的卵白蛋白沉淀,另一种可被偶氮砷酸卵白蛋白沉淀。这表明抗原大分子当有两个以上决定簇时,每一决定簇可引起专一性不同的抗体。抗原有两个以上的决定簇时,总的免疫原性就增高。

2. 载体效应 (Carrier effect)

结合抗原诱导的免疫反应中,抗体的专一性虽然依赖于半抗原决定簇,但是整个载体蛋白质大分子对于抗体反应的性质和量也是有影响的。如用一个结合蛋白质(半抗原A+载体A)免疫动物,所产生的抗半抗原A的体液抗体,能和同一半抗原(A)加另一载体(B)的结合蛋白质起反应。但是,如果用半抗原(A)加另一载体(B)来第二次免疫此动物时,并不能刺激次级免疫反应。此时,半抗原A的抗体反应仍呈现初级免疫反应的特点。也就是说,虽然半抗原A(决定专一性的部分)没有改变,而只是载体(B)不同于初级反应中所用的载体(A),结果半抗原(A)的抗体产生也会受到改变载体的影响。这一现象称为"载体效应"。此外,DNP半抗原和无免疫原性的载体结合时,不能诱导抗体形成;如改变为和另一个有免疫原性的载体结合进行免疫时,就能产生半抗原专一的抗体。这一实验进一步提示,免疫活性细胞对载体决定簇的识别是诱导体液抗体的产生以及对半抗原决定簇本身识别的必要前提。

许多实验表明,载体效应是抗体形成中两类淋巴球协同作用的结果。家兔用对氨基苯磺酸-BSA初级免疫后,再用同一结合抗原免疫时便能产生很强的对氨基苯磺酸的次级抗体反应。如果次级免疫时载体改用HGG,就不发生次级抗体反应。在后一情形下,如果家兔在次级免疫几周以前曾经单独用HGG免疫,也能产生很好的对半抗原的次级抗体反应(Rajawsky等,1969)。这一类实验表明诱导半抗原抗体形成,可能需要不同的淋巴球分别对载体决定簇和半抗原决定簇起相互作用,并且这两种相互作用对半抗原抗体的产生都是必需的。在用不同的结合抗原或载体继承免疫过的小鼠淋巴球离体实验中,发现被结合抗原(NIP-BSA)致敏过的淋巴球,当用和另一载体结合的结合抗原(NIP-CGG)刺激时,不能产生显著的免疫反应。但是,如果同时加入经过另一载体CGG致敏过的细胞(辅助细胞)时,就有明显的半抗原抗体形成。对于这同一个离体系统,用对T细胞专一的抗θ血清处理经过载体致敏的辅助细胞时,抗半抗原抗体的产生便显著地下降,而用抗θ血清处理NIP-CGG致敏过的细胞(抗体形成细胞)则没有明显的影响(Raff, 1970)。这一实验和其他类似的实验(Roelants和Askonas, 1971; Rittenberg和Bullock, 1972),都发现和载体决定簇起反应的细胞似乎对抗θ血清敏感,因而可能是T细胞,而产生半抗原抗体的细胞则不敏感,可能是B细胞。总之,载体效应的发现是对抗体形成中两类淋巴球协同作用的有力的支持。可以假定T细胞的抗原受体带有载体专一性,而B细胞的抗原受体带有半抗原专一性,因而整个抗体反应在总体上也就呈现出载体效应了。载体效应涉及免疫学的许多重要理论问题,将陆续在以后有关的章节中讨论。关于载体效应的一般论述可参考Benacerraf等(1970)的综述。

3. 半抗原和药物过敏

半抗原蛋白质结合物的研究有助于解释一些化学品和药物过敏现象。火药厂工人接

触三硝基苯甲硝胺，这种炸药的苦味酸基团易与皮肤蛋白质结合而引起过敏反应。苯胺类染料，甚至低分子量的醇都可以对某些敏感的人引起过敏反应。药物过敏是临床常见的现象。如一种镇静剂司眠尿（Sedormid）能和血小板络合，引起抗血小板抗体而造成血小板缺乏性紫癜症。对红血球有亲合力的药物引起的溶血性贫血以及药物诱发的白血球减少症都是属于这种性质的。常用退热药阿斯匹林对一些敏感病人也能引起严重变态反应。另一种退热药氨基比林也可在一些人引起严重的过敏性休克，并且过敏状态可经血清传递。抗生素类药物，如几种四环素都可能引起速发型变态反应。临床上最常见并可能造成死亡的是对青霉素的过敏反应。这可能是由于青霉素转变成青霉素酸和体内蛋白质结合而引起的。此外，发酵过程中产生的青霉素酰蛋白质杂质也可能是引起过敏的原因。

目前假定脂溶性药物引起过敏的机制的第一步是先经细胞内微粒体酶转变，然后再和体内蛋白质结合成抗原引起变态反应（Smaster，1971）（图 1-3）。

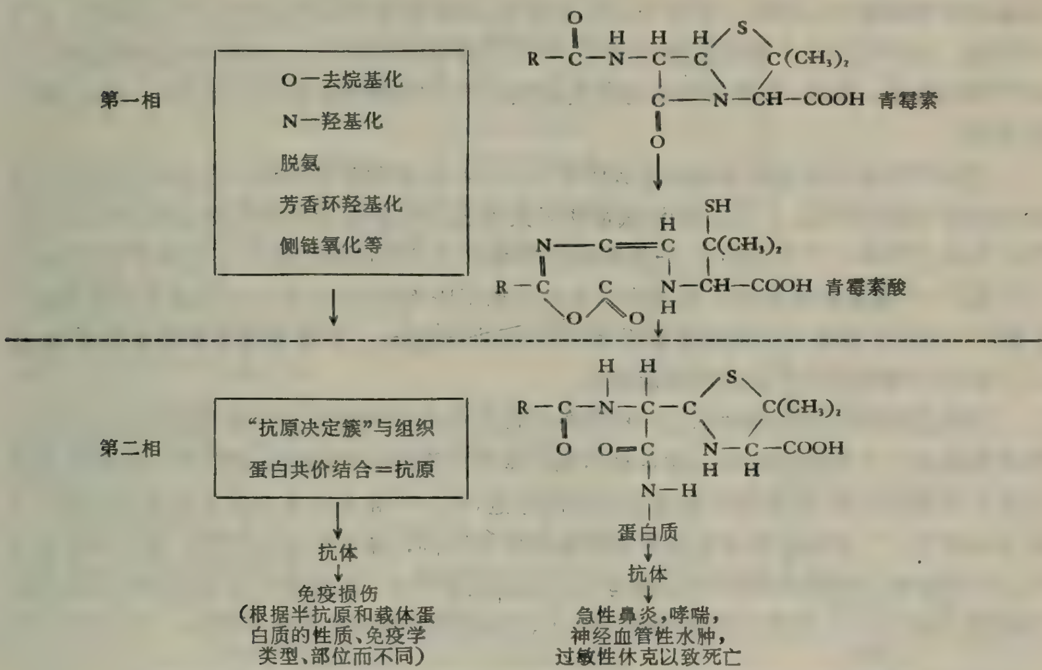
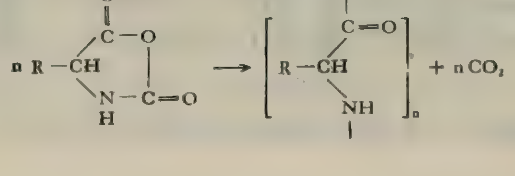


图 1-3　脂溶性药物经细胞内微粒体酶转变后和体内蛋白质结合引起药物过敏反应的机制（据 Smaster，1971）。

（二）人工合成多聚氨基酸的免疫原性和抗原专一性

通过氨基甲酸酐聚合作用可以合成各种多聚氨基酸：



Sela 实验室关于人工合成多聚氨基酸的系统性研究，对于了解蛋白质免疫原性和抗原专一性的构造基础有重要的理论意义（Sela，1969，1970，1972，1973），其结果简述如下：

1. 免疫原性的分子基础

各种氨基酸聚合物的系统研究证明，氨基酸的直线单一聚合物（Linear homopolymer）没有免疫原性。已知明胶(胶原的部分水解产物)也是弱的免疫原。然而，如果把芳香族环氨基酸(酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸)或胱氨酸的单一聚合物与明胶的 ε- 赖氨酸结合作为免疫原时，便能引起对多聚酪氨酸、多聚色氨酸和多聚苯丙氨酸等的大量抗体。多聚甘氨酸、多聚丙氨酸、多聚谷氨酸、多聚赖氨酸、多聚丝氨酸等则无此种增强免疫原性的作用。

虽然这些芳香环氨基酸可加强合成多聚氨基酸的免疫原性，但不是绝对不可缺少的。谷氨酸和赖氨酸各自的单一聚合物无免疫原性，而谷氨酸和赖氨酸的混合聚合物则有免疫原性。如果再加入少量酪氨酸残基时，免疫原性还要增加；加入少量丙氨酸残基时，也有这样的作用。因此，多聚氨基酸的免疫原性随组成氨基酸的多样性和不均一性的增加而增加。

光学异构物对免疫原性也有很大的影响。d-氨基酸多聚物和 l-氨基酸多聚物的免疫原性有显著的不同。过去用 d-氨基酸多聚物进行的免疫动物的实验都没有得到正结果。后来才发现这并不是由于 d-氨基酸多聚物本身没有免疫原性，而是由于实验条件不合适。d-氨基酸多聚物引起抗体的能力依赖于所用的剂量。每只小鼠最大有效剂量为 1 微克，超过此剂量就引起免疫耐受性，而不是产生抗体。d-氨基酸多聚物免疫原性的这一特性可能和它不易被代谢降解有关。

多聚氨基酸的免疫原性不但和抗原决定簇的化学结构有关系，而且依赖于这些决定簇在载体分子上的空间位置。对各种结构的氨基酸聚合物的系统研究证明，抗原决定簇在分子表面的外露，因而能与免疫活性细胞接近，对于产生免疫反应是有决定意义的。如图 1-4 所示，三种合成的叉链多聚氨基酸的结构不同，免疫原性也不同。图 1-4a，多聚-d，l-丙氨酸连结到多聚-l-赖氨酸骨架上形成叉链构造，在叉链的末端再连结上强抗原决定簇 Tyr，Glu 残基。在这样的构造上，抗原决定簇外露在分子表面，易于接近，因

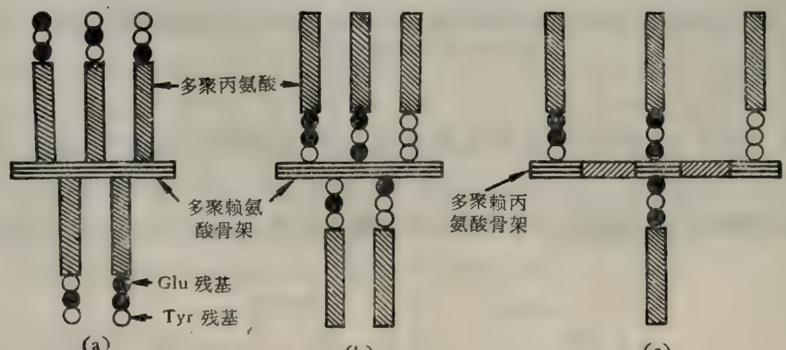


图 1-4 三种合成的叉链多聚氨基酸(据 Sela，1966)。

而表现为很强的免疫原。图 1-4b，交换了多聚-d，l-丙氨酸和 Tyr，Glu 残基的相互位置，原来的强抗原决定簇 Tyr，Glu 移到分子内部和多聚赖氨酸骨架直接相连，并被外露的多聚丙氨酸掩盖。结果这种构造便失去免疫原性，不能引起抗体。图 1-4c 中，多聚-l-赖氨酸骨架被换成多聚丙氨酰赖氨酸骨架。由于侧链只能和赖氨酸残基相连，结果侧链间的距离扩大了。Glu、Tyr 虽仍留在分子内部，但有可能被接近。这种构造又能引起抗体了。因此，抗原决定簇在分子表面上外露，能被免疫活性细胞接近是免疫原性的必要条件。

2. 抗原决定簇的大小

利用人工合成的多聚氨基酸可以精细地测量抗原决定簇的大小。例如，用 l-丙氨酸的 2 肽、3 肽等一系列的短肽来抑制多聚-l-丙氨酸和其抗体的沉淀反应。抑制程度随短肽链长的增加而增加，5—6 肽时达到最大值。l-丙氨酸 5 肽的大小约为 25×11×6.5 Å。这可能相当于多聚-l-丙氨酸抗原决定簇大小的上限。尤其有兴趣的是，有人把多聚-d-赖氨酸和磷酸化牛血清白蛋白混合后加佐剂注射家兔。于是抗体形成系统便受到和抗体的结合位点的假定的大小比较起来要长几百倍的抗原(650 lys 残基)的刺激。可是产生的抗体仍受赖氨酸 5 肽最大程度地抑制。5 肽以上，链长继续增加，抑制程度不再增加（图 1-5）（Kabat，1966）。

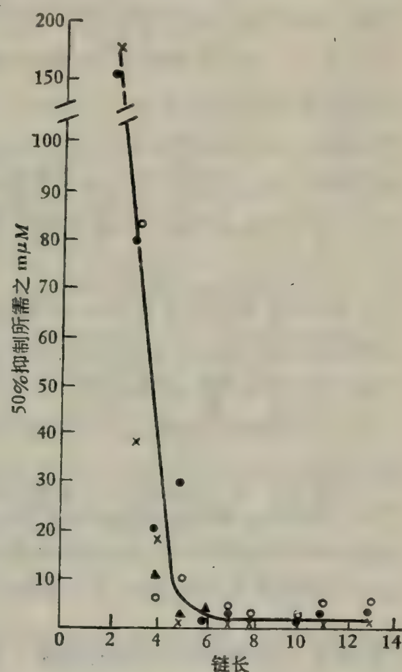


图 1-5　抗多聚-d-赖氨酸和 0.06毫克多聚-d-赖氨酸补体结合产生 50% 抑制所需d-赖氨酸短肽的量（据 Kabat，1966）。

经这样测定得到的几种人工合成多聚氨基酸抗原决定簇的大小见表 1-2。

此外，用类似方法，在多聚-d-丙氨酸系统还证明，IgG 和 IgM 的结合位点大小相似，都相当于 4 肽的大小。

利用类似方法还可以进一步探讨抗原决定簇和抗体结合位点细微的空间互补关系。例如，用 (d-Ala)*n*，(*n*=2 到 5)；(d-Ala)*n* Gly，(*n*=1 到 4)；(d-Ala)*n*-Gly-ε-氨基己酸 (*n*=1 到 3) 等一系列长短不同的合成短肽半抗原来抑制 (d-Ala) *n*Gly (*n*=1 到 4)-载体蛋白质与其同型的半抗原抗体间的沉淀反应。结果发现，丙氨酸的 4 肽就能产生最大抑制。在这一系统中，抗原决定簇大小的上限似略小于上表列举的数据。特别值得注意的是 d-Ala-Gly-ε-氨基己酸对此抗原抗体系统的抑制要比 $(d\text{-}Ala)_2$Gly-ε-氨基己酸要有效得多。若假定抗体的结合位点可细分为几个亚区 (S_1 到 S_4)，每一亚区适合一个特定的氨基酸残基，如 S_1 亚区适合于半抗原的 NH_2 末端残基，于是便可以解释上述观察了。d-Ala-Gly-ε-氨基己酸能与结合位点完全密合地互补（图 1-6a）；$(d\text{-}Ala)_2$ Gly-ε-氨基己酸和前者在构造上唯一的区别是多了一个 Ala 残基，但由于第二个 Ala 残基缺少游离的 α-氨基，和 S_1 亚基在空间上不能密合（图 1-6b），从而影响了整个抗原决定簇和抗体的结合

位点的结合。因此前者的抑制能力要比后者强很多。

表 1-2 几种抗原决定簇估测大小

抗 原	决定簇	大小(Å)	分子量
Glu60Ala40, Glu60Ala30Tyr10 和 Glu42 Lys28Ala30	6 聚谷氨酸	36×10×6	792
多聚丙氨酸牛血清白蛋白	5 聚丙氨酸	25×11×6.5	373
多聚赖氨酸兔血清白蛋白	5 (或 6)聚赖氨酸	27×17×6.5	659
多聚赖氨酸磷酸牛血清白蛋白	5 聚赖氨酸	27×17×6.5	659

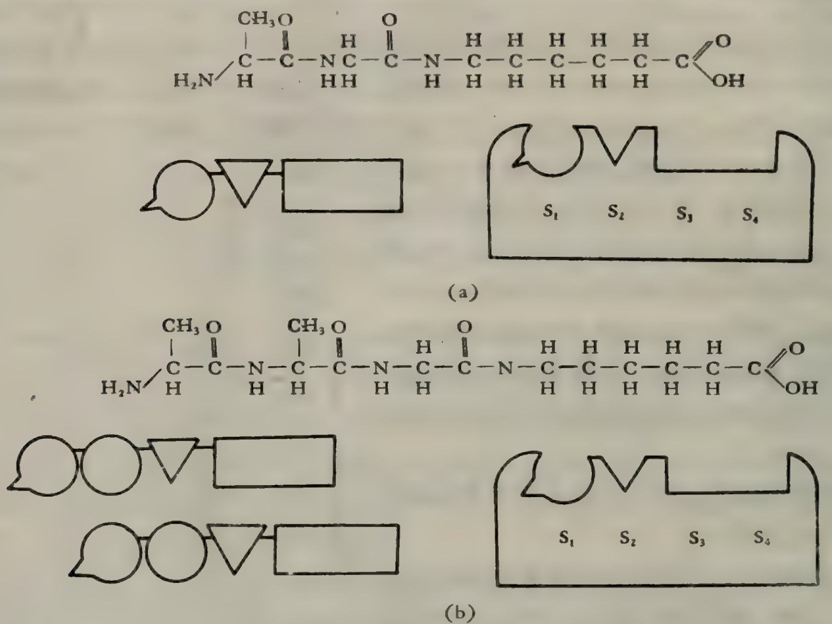


图 1-6 对 d-Ala-Gly-ε-氨基己酸抗原决定簇之抗体的结合位点。结合位点包括 4 个亚基 (S_1—S_4)，每一亚基适合于决定簇的特定部分：S_1=d-Ala (含游离 α-氨基) 之 NH_2 末端；S_2=Gly 残基；S_3S_4=ε-氨基己酸之羧基端。 (a) 代表 d-Ala-Gly-ε-氨基己酸多肽与结合位点之空间互补关系。 (b) 代表 (d-Ala)$_2$-Gly-ε 氨基己酸多肽与结合位点在空间上不配合 (据 Sela, 1969)。

3. 抗原专一性和空间构象的关系。顺序决定簇和构象决定簇

利用具有不同的空间构象的人工合成多聚氨基酸来研究抗原专一性和空间构象的关系，得到很有理论价值的结果。Sela (1967) 合成下列具有不同构象的、均含有 Tyr-Ala-Glu 3 肽的聚合物：

1) Tyr-Ala-Glu 3 肽连接到叉链多聚丙氨酸-赖氨酸上，形成一个缺少有规则螺旋结构的多聚物(简称为 TAG-L)；

2) Tyr-Ala-Glu 的高分子量聚合物，简称为 (TAG)n，具有 α-螺旋构象，并和胶原的构象有些相似(图 1-7)。

多聚物 TAG-L 和 (TAG)n 对家兔都能引起大量抗体形成，但 TAG-L 和 (TAG)n 之间在免疫学上无交叉反应。TAG，(TAG)$_2$ 能有效地抑制叉链多聚物 TAG-L 与其同型抗体的免疫反应，而不能抑制有 α-螺旋构象的多聚物 (TAG)n 和其同型抗体的

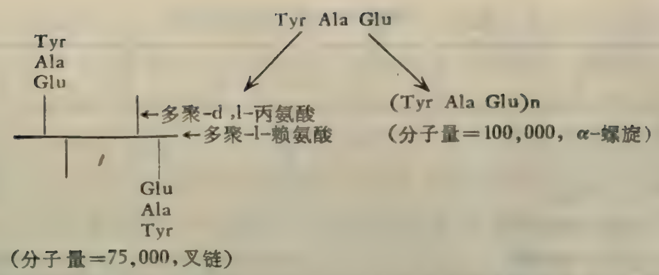


图 1-7　人工合成的叉链多聚氨基酸，其中 Tyr-Ala-Glu 多肽连接到叉链-多聚-Dl-丙氨酰-多聚-l-赖氨酸之侧链的末端(左)，(Tyr-Ala-Glu) 3 肽之周期性多聚物(右)(据 Sela，1969)。

反应。$(TAG)_3$ 对 $(TAG)_n$ 抗原抗体系统也只有弱的抑制作用，而 $(TAG)_7$，$(TAG)_9$ 则为有效的抑制物。因此，假定只有具 α-螺旋构象的 $(TAG)_n$ 构造才能和抗 $(TAG)_n$ 抗体起反应。这要求或者这些多肽，$(TAG)_7$ 和 $(TAG)_9$，在生理条件下具有 α-螺旋构象，或者虽然缺少这种构象，但在和抗体的结合位点相互作用时，能获得这种构象。圆二色谱测量发现，$(TAG)_n$ 当 ($n=7$，$n=9$，……$n=13$) 时，都只含有很少的 α-螺旋构象。然而，当多肽 $(TAG)_{13}$ 和抗 (TAG)n 抗体相互作用时，α-螺旋含量就显著增加 (Schechter 等，1971)。也就是说，这些多肽在和抗体结合位点相互作用时，发生构象转化 (Transconformation)，成为适合于一定空间构象的决定簇。另一方面，具 α-螺旋构象的多聚物 $(TAG)_n$ 的抗血清能和几种动物的胶原起交叉反应，也说明 $(TAG)_n$ 的抗原专一性对 α-螺旋构象的依赖。

总之，这些实验清楚地证明多聚物 $(TAG)_n$ 的抗原专一性依赖于分子特定的空间构象，而不是依赖于肽链的一级结构顺序。这种依赖空间构象的决定簇，称为构象决定簇 (Confonmational determinant)。反之，多聚物 TAG-L 的抗原专一性只依赖于其一级结构顺序。因此，又可称为顺序决定簇 (Sequential determinant)。Sela 还进一步认为，构象决定簇可能是位于伸展的肽链上相距很远的几个残基，或位于不同肽链上的几个残基，由于抗原大分子内肽链的盘曲而在空间上彼此靠近，共同组成的。因此，其专一性依赖于抗原大分子整体或局部的空间构象。抗原大分子的空间构象改变，专一性也随之改变。顺序决定簇只依赖于肽链的一级结构顺序，其专一性不随分子构象的改变而改变。这些概念对于了解天然蛋白质的抗原专一性对其各级空间构象的依赖关系是很重要的。

4. 细胞免疫和体液免疫

多聚氨基酸也可以作为简单分子(半抗原)的载体，而使半抗原成为真正的抗原。例如，多聚-l-酪氨酸(本身无免疫原性)，当它和重氮化氨基苯磺酸结合后，就获得很好的免疫原性。这样一类低分子量的合成免疫原列于表 1-3 内。免疫原性的强度，以及所引起的免疫反应的类型(细胞免疫或体液免疫)与多聚氨基酸载体分子的链长有关系。如把重氮化氨基苯砷酸连接到 3 聚-l-酪氨酸或 6 聚-l-酪氨酸，得到的产物没有诱导体液抗体形成的能力，但仍能诱导迟发型超敏反应。不过，这些低分子量的合成抗原，加 Freund 佐剂时，仍能引起体液抗体。Ben-Efram (1971) 对 α-DNP-(l-lys)n 合成抗原系统的实验还清楚地表明免疫原性对链长 (n) 的依赖关系，并提示无论在免疫原性或抗原专

表 1-3 一些低分子量的合成免疫原

化合物	分子量	免疫的动物
α-二硝基苯-7 聚-l-赖氨酸	1,080	豚鼠
P-偶氮苯砷酸-6 聚-l-酪氨酸	1,200	豚鼠,兔
P-偶氮苯砷酸-3 聚-l-酪氨酸	750	豚鼠,兔
P-偶氮苯砷酸-N-乙酰-l-酪氨酰胺	450	豚鼠
P-偶氮苯砷酸-N-乙酰-l-酪氨酸	451	豚鼠

一性方面,细胞免疫和循环抗体对载体的要求都是不同的,诱导或皮试时引起细胞免疫反应所要求的载体链长都比较短。

最后,还应提到合成抗原的构象对细胞免疫同样是重要的。含 Glu, Lys, Tyr 的直链多聚物和叉链多聚物在迟发型超敏反应上,没有交叉反应。用多聚-(Pro-Gly-Pro)的有规则的排列顺序的多聚物致敏动物,当用 (Pro, Gly) 的无规则排列的多聚物作皮试时,也没有交叉反应。

5. 免疫原的总电荷

对于 P-偶氮苯砷酸抗体和结合抗原系统的研究发现,免疫原的总电荷和诱导的抗体的总电荷呈反比,并且这是依赖整个免疫原分子的总电荷,而不是依赖半抗原决定簇附近的局部电荷,这一现象称为总电荷反比效应。在不同物种,如家兔、小鼠和山羊,以及不同类别的抗体,IgG、IgM 和 IgE,均得到证实。如酸性的白喉类毒素的抗体和带负电荷的合成多聚氨基酸的抗体,经 Deae-Sephadex层析分离时,都主要在第一个峰内出现;而碱性溶菌酶的抗体和带正电荷的合成多聚氨基酸的抗体主要在第二个峰内出现(Sela, 1971; 1973)。抗 DNP 半抗原抗体的电荷性质(出现在第一个峰或第二个峰)同样取决于和半抗原相连的载体分子的总电荷。和电荷不同的载体连接的结合抗原,免疫产生的抗半抗原抗体的总电荷不同,但对半抗原的结合专一性和亲合力并没有不同。这说明抗体总电荷的差异应局限于其结合位点以外的部分。这些实验还提示,载体的电荷对形成的抗体的总电荷有影响,并且免疫原是以完整的大分子形式和免疫活性细胞相互作用的。

最近,进一步阐明了抗原抗体总电荷反比效应的细胞基础。已知玻璃珠表面是酸性的(带负电荷),因此,当用这种玻璃珠过滤脾脏细胞时,表面偏碱性(带正电荷)的细胞便被吸附,而表面偏酸性(带负电荷)的细胞较易通过。理论上,经玻璃珠过滤的细胞,较易于和碱性的免疫原(带正电荷)相互作用。经过 X 射线照射的小鼠,接种不同数量的、经过不同处理的同基因型的脾脏细胞,然后再用酸性免疫原 DNP-901 [多聚 (Tyr, Glu, Lys)],或碱性免疫原 DNP-912[多聚(Tyr, Glu, Lys)]免疫。当用经过玻璃珠过滤的脾脏细胞接种时,能和 DNP-901 (酸性载体)反应的细胞被吸附去除了,而能和 DNP-912 (碱性载体)反应的细胞数目却没有改变。结果产生的抗 DNP 抗体的总电荷是负电性的。反之,玻璃珠表面镀一层碱性的多聚-l-赖氨酸时,则能选择地吸附表面较酸性的细胞。结果经过这种玻璃珠过滤的细胞,对碱性 DNP-912 的反应显著减少,而对酸性 DNP-901 的反应却没有变化。这些实验清楚地证明荷电的免疫原倾向于选择能合成电荷相反的抗体的淋巴细胞。

按照两类细胞协同作用的假说,体液抗体的形成中,需要 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞

的合作。于是就可以提出一个问题，免疫原抗体电荷反比效应是与那一类细胞有关系。用玻璃珠过滤的胸腺细胞（T 细胞），加未分离的骨髓细胞（B 细胞），这样的细胞混合物对 DNP-酸性载体的抗半抗原抗体反应降低，而对 DNP-碱性载体的半抗原抗体反应却没有改变。反之，经过玻璃珠过滤的骨髓细胞（B 细胞），加未分离的胸腺细胞（T 细胞），这样的细胞混合物，无论对 DNP-酸性载体或 DNP-碱性载体的抗半抗原抗体反应都没有变化。另一方面，利用镀多聚-l-赖氨酸的玻璃珠分离 T，B 细胞的类似实验，也证明用分离的胸腺细胞和未分离的骨髓细胞混合时，对碱性免疫原的抗体反应降低，而对酸性免疫原的反应不降低。同样地，分离的骨髓细胞和未分离的胸腺细胞混合时，对于酸性或碱性免疫原的抗体反应都没有改变（Karniely 等，1973）。

以上这些实验结果证明总电荷反比现象的细胞基础是和胸腺细胞（T 细胞）有关的。不同的 T 细胞可能选择总电荷不同的免疫原。总电荷反比效应实质上是一个典型的载体效应，它不涉及半抗原决定簇和抗体结合位点本身。

附带提到，新近，用两个只是在 N 端侧链的氨基酸顺序有差别的合成多聚物在缺少 T 细胞的动物上做的实验发现，（Tyr-Tyr-Glu-Glu）-多聚（D, L-Ala）-多聚-（L-Lys）要依赖 T 细胞才能引起抗体，而（Tyr-Glu-Tyr-Glu）-多聚-（D,L-Ala）-多聚（L-Lys）则无需依赖 T 细胞的辅助就能引起抗体。因此，这两种多聚物由于 N 端侧链顺序的某种不同，独立地引发 B 细胞反应的能力也有不同（Schwartz 等，1976）。

总结起来，合成多聚氨基酸的研究表明，抗原的免疫原性依赖于分子表面外露的某些氨基酸残基（主要是酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等）。氨基酸分子组成的不均一性也可以增加免疫原性。光学异构对免疫原性和抗原专一性有很大影响。足够大小的分子量是强免疫原性的重要条件，但某些分子量很小（450—1,000）的半抗原多聚氨基酸也能引起免疫反应。抗原的专一性不但决定于分子表面决定簇的性质和数目，而且决定于分子的空间构象。抗原决定簇按其性质，依赖多肽一级结构顺序或抗原大分子的空间构象，区分为分子顺序决定簇和构象决定簇两大类。细胞免疫和体液免疫所要求的抗原结构可能有不同。这些结果，以及研究方法对于探讨天然蛋白质免疫原性和抗原专一性的结构基础提供了很有价值的借鉴。此外，这些研究对于免疫反应能力的遗传基础、耐受性、载体效应和抗原竞争现象等免疫学基本问题都有开创性的贡献，将在有关章节再作讨论。

如上所述，人工合成多聚氨基酸的研究固然有其理论上的重要意义，但毕竟只是模拟性实验。更为重要的发展方向应当是按照天然蛋白质分子已知的一级结构和抗原构造，合成含有天然抗原的一定的抗原决定簇的人工合成抗原。这是一个将促使预防免疫面貌一新的科学理想，只有在对天然蛋白质分子的免疫原性和抗原专一性的结构基础有比较透彻的了解后，才可望实现。

二、蛋白质抗原

天然蛋白质注射到各种脊椎动物体内，便能引起抗体的合成。这些抗体能专一地和蛋白质分子表面构造的确定区域，即抗原决定簇起反应。同时，一个异源蛋白质除能诱导循环（体液）抗体外，还可能专一地诱导细胞免疫反应。所有蛋白质或许都可能有免疫原性，不过个别蛋白质免疫原性的强弱可能差别悬殊。同样地，虽然一个异源蛋白质能同时

诱导体液抗体和细胞免疫，对于不同的蛋白质，所引起的这两种免疫反应的相对强度也可能差别很大。大量实验事实提示，蛋白质的免疫原性和抗原专一性不仅决定于分子表面的局部构象以及抗原决定簇的性质和数目，而且还依赖于它们的空间排布，即整个大分子的构象。免疫原性和抗原专一性在分子构造上的要求亦有所不同，并且诱导体液免疫或细胞免疫部分地也依赖于蛋白质分子构造的区别。例如，一般说来，变性蛋白质的免疫原性要比相应的天然蛋白质低；蛋白质的物理状态（聚集）对抗原专一性几乎没有影响，然而对免疫原性却有很大的影响；对于某些多聚体抗原（如细菌的鞭毛素），分子的聚合程度（单体或多聚体）还可能调节免疫反应的类型（细胞免疫或体液免疫）。

本节将讨论天然蛋白质和多肽的免疫原性和抗原专一性与分子结构的关系。详细的文献综述可参考 Borek (1972), Parish 和 Ada (1972), Benjamine 等 (1972), Atassi (1973; 1975), Crumpton (1974) 和 Reichlin (1975)。为了叙述方便，先谈抗原专一性，然后再谈免疫原性的分子基础。

（一）蛋白质的分子结构和抗原专一性

蛋白质的抗原专一性和其各级结构都可能有关系。为便于了解，先简略地介绍一下蛋白质结构的基本概念。

1. 蛋白质的四级结构

蛋白质是由氨基酸分子首尾相连形成的多肽链构成的，氨基酸残基的数目和顺序决定蛋白质的一级结构（图 1-8a）。肽链按螺旋形盘曲，圈与圈之间主要靠氢键维系固定，为蛋白质的二级结构（图 1-8b）。由于氨基酸残基侧链间的相互作用，螺旋又按一定的方式折叠盘曲，为三级结构（图 1-8c）。天然蛋白质分子可能由几条相同的或不同的肽链组成。这几条盘绕的肽链又可按一定的空间关系结合起来，组成复杂的分子，为四级结构（图 1-8d）。此外，蛋白质分子还可以和脂类、核酸、多糖等结合起来，或者携带较小的其他基团，如金属离子和维生素、核苷酸等辅基，更增加了结构的复杂性。

一个蛋白质分子的天然构象 (Conformation) 是由共价键或非共价键维系的。这些作用力保证肽链按一定的空间秩序排布成稳定的形态，而不致成为一个紊乱的线团。共价键中最重要的是二硫键，它能把一条多肽链的不同部分连接起来（如核糖核酸酶或溶菌酶），或者把不同的多肽链连接起来（如胰岛素、免疫球蛋白）。胰岛素、免疫球蛋白等不仅有链间二硫键，同时还有链内二硫键。非共价键包括氢键、离子键以及疏水性相互作用，蛋白质分子和溶剂间的相互作用。此外，蛋白质分子的天然构象，就四级结构而论，还受金属离子和辅基的影响。总之，一个天然蛋白质分子的结构是由所有这些键共同来维持的，维持二级结构和三级结构的键也就是维持多肽链之间的结合（四级结构）的键。但是，归根结蒂蛋白质分子的空间构象是由一级结构决定的。

蛋白质按其分子形状和结构可分为两大类：球蛋白和纤维蛋白。球蛋白的轴比较小，分子的多肽链通过 α-螺旋、β-折叠和非螺旋方式，盘曲成球形或椭球形。纤维蛋白的轴比大，只具有 α-螺旋、β-折叠或三股螺旋等三种构象中的一种构象，分子往往由许多重覆单位相连成长棒状。球蛋白在物理的或化学的因素（如高温、过酸和过碱）以及浓尿素、

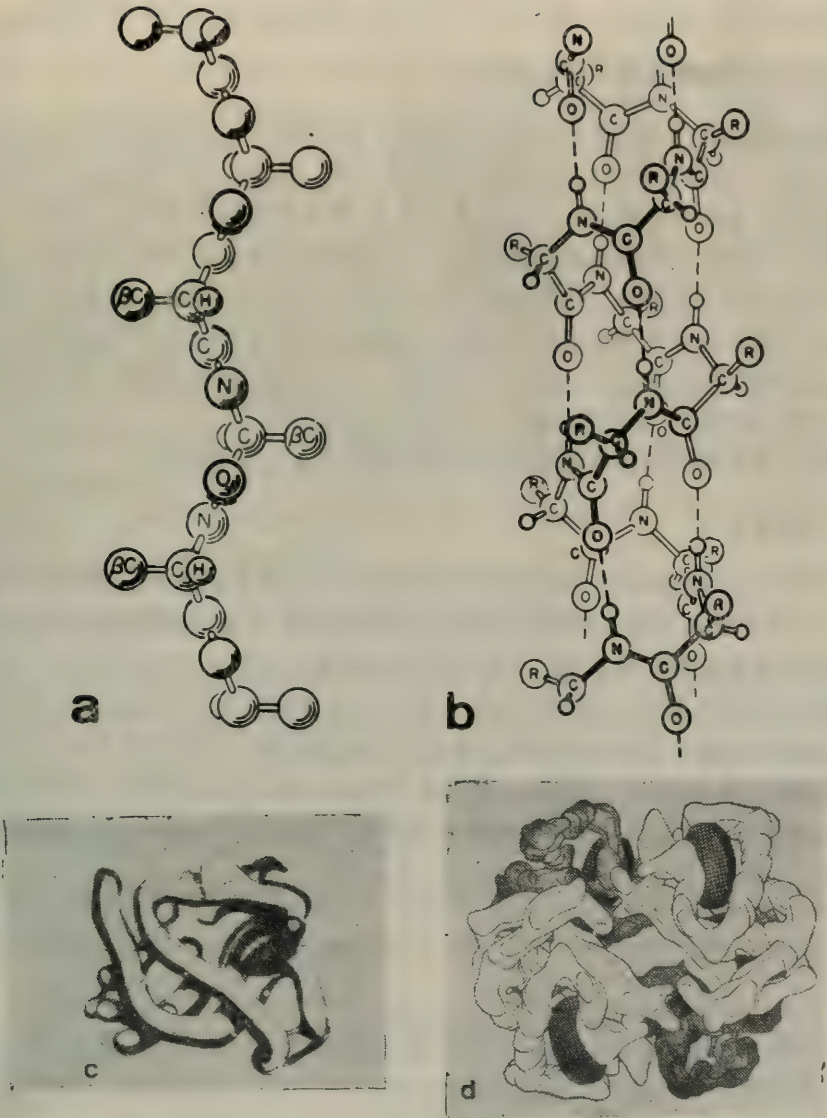


图 1-8　蛋白质各级结构模型图。(a) 初级结构。　(b) 二级结构(α-螺旋)。(c) 三级结构(肌红肌)。　(d) 四级结构(血红蛋白)。 白色表示 α链；　灰色表示β链；黑圆盘表示正铁血红素；C和N表示两条α链的C端和N端。(据 Niederwieser 和 Pataki, 1971)。

胍、硫酸十二烷基钠等解离剂的影响下，盘曲的多肽链伸展，失去分子的天然构象，而发生变性。

蛋白质分子的固定构象对其生物学功能是很重要的。 由于多肽链按一定方式盘曲，多肽链间的连结和结合而保持固定的空间形态，同一条多肽链上不同地点的或不同多肽链上的氨基酸残基可能彼此靠近，并按一定的图式分布在分子表面，组成特定的局部构象，担任特定的生物学功能(如酶、激素的活性中心，抗体结合位点等)。作为抗原来说，这种特定的局部构象就是抗原决定簇或表位 (Epitope)。 因此，蛋白质变性或改变个别残基的侧链时，分子的整个或局部构象因而改变或破坏，其生物学功能(就抗原而论即抗原

性)也就随之改变或破坏。这一概念对于了解蛋白质的抗原专一性是很重要的。

2. 蛋白质各级结构和抗原专一性的关系

大多数蛋白质都是具有复杂结构的大分子。蛋白质的一级结构(多肽链的氨基酸排列顺序)从根本上决定了分子的空间构象和分子形状。抗原之专一的免疫学功能主要依赖于分子表面的某些化学基团——决定簇的性质、数目和空间排布图式。抗原决定簇选择地和某些免疫活性细胞表面的抗原受体结合,从而决定将来形成的抗体的专一性。注射提纯的(化学上均一的)蛋白质抗原,总产生不同的(不均一的)抗体。造成这一现象的部分原因是由于蛋白质分子表面有许多不同的决定簇,因而诱导出在质和量上都不同的各种抗体。能诱导出高浓度的专一抗体的决定簇,称为"免疫优势的"("Immunodominant");无效力的称为"免疫静止的"("Immunosilent")。

天然蛋白质的各级结构都可能和抗原专一性有关系。分述如下:

(1) 一级结构

许多纤维蛋白(如丝蛋白、胶原等)和多肽(如促肾上腺皮质激素、促胃液素和高血压肽等)以及由于变性而伸展的球蛋白(如氧化核糖核酸酶,还原并羧甲基化的溶菌酶等)均存在依赖一级结构的顺序决定簇。它们的构造和位置可用半抗原竞争抑制法(即利用抗原的酶解断片抑制该抗原和抗体的反应)来测定。这些研究的结果发现这几类抗原的抗原结构具有共同特点:和体液抗体反应的抗原决定簇的数目是很有限的(一条分子量10,000 的多肽大约只有两个决定簇),它们在多肽链上的分布是间断的,其间被免疫静止区域隔开;并且它们往往还倾向于分布在多肽链的 C 端或 N 端。例如,氧化核糖核酸酶有

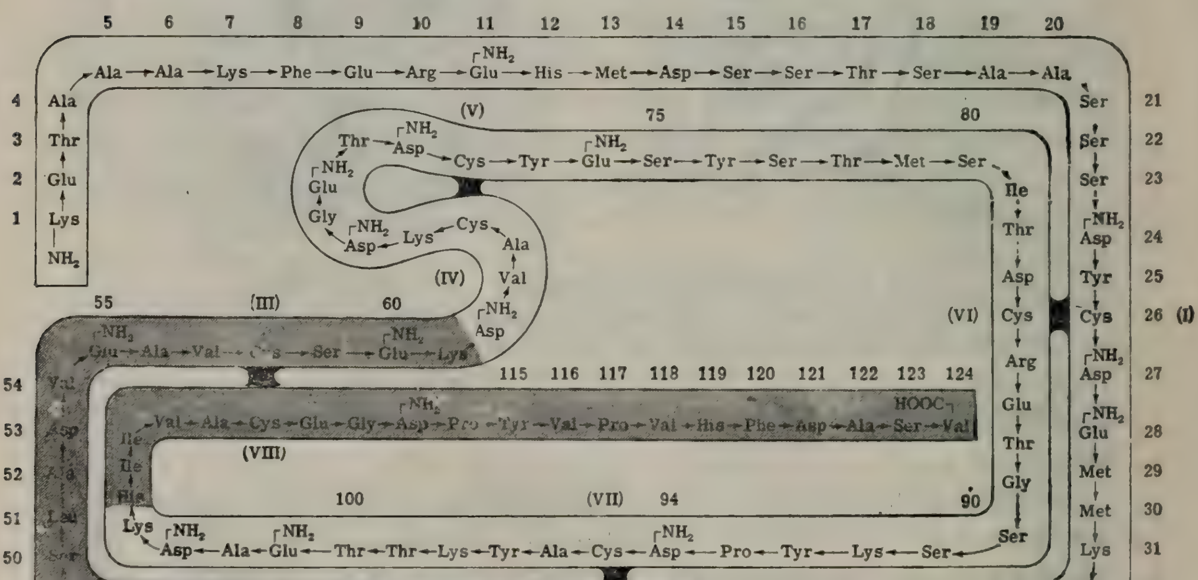


图 1-9 牛胰核糖核酸酶之一级结构。深色区域表示氧化的酶分子上抗原决定簇的位置(38—61,105—124)。

两个抗原决定簇，其一分布在伸展的多肽链上顺序（38—61）的位置，另一位于C端顺序（105—124）的位置。这两段都富含非极性氨基酸(图1-9)（Brown, 1962; Liu 和 Brown, 1972）。在免疫活性肽段内的各氨基酸残基的抗原活性强弱也有不同。如氧化核糖核酶顺序（38—61）肽段和羧甲基化溶菌酶顺序（74—96）肽段的N端两个氨基酸残基被去除后，这些肽段的免疫学活性就分别降低60％和100％。这说明一个抗原决定簇假定有6—7个残基大小，其中只有一小部分（1—2残基）对抗原专一性有关键意义，可视为“免疫优势基团”。除去上述共同点外，比较丝蛋白和伸展的球蛋白的抗原构造时，可发现一个显著的不同点。丝蛋白的抗原活性可被它的任一个胰蛋白酶酶解断片全部抑制（Cebra, 1961）。这可能是由于其决定簇都具有相似的构造和专一性。分子伸展的球蛋白则不然，它的几个决定簇却具有各不相同的专一性。如铁氧还蛋白（Ferredoxin）的N端7肽和C端5肽的混合物抑制氧化的铁氧还蛋白和同型抗血清结合的抑制程度达到约90％，远超过任一肽段单独的抑制作用（分别约为40％和55％）（Kelly 和 Levy, 1971）。这种差别可能归因于丝蛋白这一类纤维蛋白的一级结构存在重复顺序，而球蛋白则几乎完全不存在重复顺序。

(2) 二级结构

抗原专一性也可能依赖多肽链的二级结构。如付肌球蛋白（具有完全的螺旋构象），其抗原决定簇正好位于有螺旋构象的地方（Kunz 和 Gill, 1964）。从一种细菌（Bacillus anthracis）的荚膜分离出的多聚-γ-D-谷氨酸，其部分水解产物的抗原性和肽段的长度有关系。当肽段的长度增加到6肽以上时，和抗多聚-γ-D-谷氨酸抗体的结合能力就加强了。另一方面，用旋光色散法证明，这种多肽要达到7肽以上的长度在溶液内才会出现螺旋构象。这提示多聚-γ-D-谷氨酸的主要抗原决定簇可能是螺旋结构（Goodman, 1969）。

(3) 三级结构

对于球蛋白，空间构象是决定抗原性最重要的，也是最容易受到破坏的因素。球蛋白的抗原性对空间构象的依赖，在蛋白质变性中最明显地表现出来。无论用化学的或物理的方法使蛋白质变性，或破坏分子内部的二硫键时，其免疫原性和抗原专一性也随之改变。一般说来，变性蛋白质的免疫原性和抗原专一性都降低和改变了。如核糖核酸酶经过碱处理后和天然酶的抗体的反应减弱了；当二硫键破坏后，就完全无反应；并且失去在家兔引起循环抗体的能力。羧甲基化的变性牛血清白蛋白和天然的牛血清白蛋白的抗血清也只有极微弱的反应(图1-10)。变性蛋白质也可能引起抗体，但这种抗体和原来的天然蛋白质抗原的专一性不同。不过有时候还可能表现一定程度的交叉反应，表明变性过程中部分较稳定的抗原决定簇尚未完全改变。有些变性蛋白质不能诱导循环抗体，但可以诱导迟发型超敏反应。变性过程中免疫原性和抗原专一性的改变可能是由于蛋白质分子空间构象的改变，原来位于分子表面的一些决定簇(构象决定簇)消失了，而一些原来埋藏在分子内部的一些决定簇(主要是顺序决定簇)暴露出来了。

用化学方法改变某些对于维持空间构象有关的氨基酸残基，可以不同程度地改变分子的构象，造成部分的到完全的变性。如肌红朊的肽链上14位置和7位置的色氨酸改变

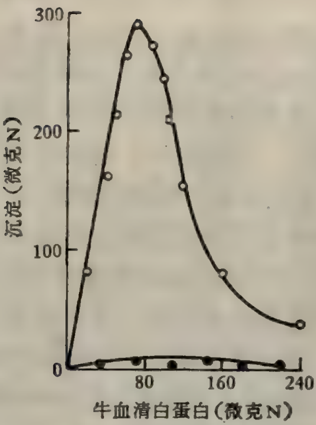


图 1-10 用天然蛋白免疫制备的抗血清测定时，天然牛血清白蛋白(○)和完全还原、羧甲基化的牛血清白蛋白(●)沉淀曲线的比较(据 Goetzl 和 Peters, 1972)。

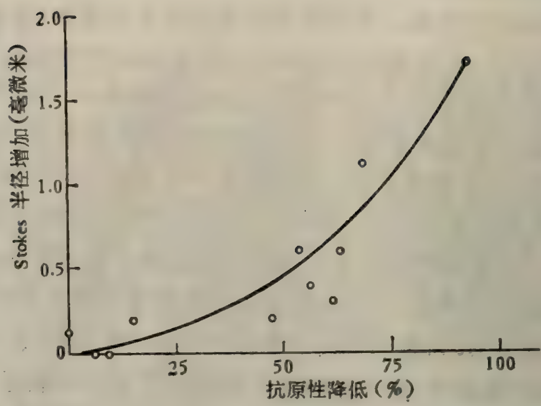


图 1-11 人血清白蛋白用各种方法改性(如乙酰化，酰胺化，琥珀酰化，羧基化，酯化和硝基化)的伸展程度与和天然白蛋白的抗体的反应能力降低之间的关系。 分子的伸展程度用改性的血清白蛋白的 Stokes 半径比天然白蛋白的增加值表示，Stokes 半径用凝胶过滤估计。抗原性降低用改性蛋白质抑制 ^{131}I- 人血清白蛋白和同型抗体结合能力(改变的 Far 氏法)测量，结果用相对于天然白蛋白的抑制程度表示(据 Crumpton, 1974)。

后，便失去分子原有的全部抗原性。从图 1-11 可看出，用各种化学方法改性的 BSA，其构象变化程度(用分子 Stokes 半径表示)和抗原性降低之间存在定量的关系 (Jacobson 等，1972)。 总之，这些实验结果清楚地表明抗原性的降低和分子的伸展程度(用旋光散射、Stokes 半径、二硫键被还原能力以及对蛋白酶酶解易感性等来量度)之间，即抗原性和分子构象之间存在确定的依赖关系。

球蛋白分子变构现象的研究，也为这方面提供了新的证据。人血红朊分子有四个抗原决定簇：两个存在于 α链，一个存在于 β链，另一个为 α链和整个分子所共有。血红朊和氧结合后，分子构象发生变化，α和(或) β亚基之间接触区域的原子发生长达 5.7 Å 的位移。氧合血红朊和脱氧血红朊分子的免疫学专一性也表现出不同 (Rheichlin 等，1964)。显然，这种抗原性的差别几乎可以肯定是和分子的上述变构现象有关联的。血红朊的辅基正铁血红素本身并无抗原性。然而把它去除后分子的构象发生改变，结果其免疫学专一性也随之改变。如果用铜原子来取代铁卟啉辅基内的铁原子，抗原性并不改变；而改用其他金属原子取代时则减弱 (Atassi, 1967)。 这同样可能是由于肌红朊的蛋白部分的构象有明显改变的结果。

总之，所有这些例子都证明球蛋白抗原的空间构象(三级结构)和分子的免疫学功能有特别密切的依赖关系。抗原大分子构象的完整性对于其免疫原性和抗原专一性都是极为重要的。同时，还有证据提示球蛋白抗原在刺激抗体的产生过程中是以完整大分子形式和免疫活性细胞表面的抗原受体相互作用的。以往认为抗原首先在体内分解是引起抗体形成的先决条件；至少对于抗原刺激免疫活性细胞的初期过程说来，这是不对的。球蛋白抗原进入体内后很可能最先是以完整的分子，而不是以酶解片段的形式和免疫活性细胞相互作用的。否则就无法解释抗原专一性对天然分子构象的依赖关系。 Sach 等(1972)比较了用链球菌核酸酶的两个酶解片段(顺序 1—126 和 99—149，参看第36页，图 1-23)

免疫得到的抗体和从用完整的酶分子免疫后得到抗血清中，用免疫吸附法分离出来的两个片段的专一抗体的抗原结合专一性。结果发现抗酶解片段抗体的专一性是识别"开链"蛋白质的决定簇(依赖一级结构的)，而从完整酶分子的抗血清中分离出来的抗体却是针对天然分子构象上的一定部位。两类抗体各自识别同一氨基酸排列顺序的不同构象。这种依赖分子构象完整性的抗体的存在，对上述观点是一个非常有力的支持。

(4) 四级结构

最后，对于某些由多个亚基组成的复杂分子，四级结构还可以提供特别的抗原决定簇。如免疫球蛋白 IgM 所引起的某些抗体是针对由两个亚基共同组成的决定簇（Mihaesco 和 Seligmann, 1968)。抗烟草斑纹病毒（TMV）血清中也含有只对抗许多亚基处于高度聚集状态时共同形成的构造的抗体。人类血红朊，在成人是由两条 α 链和两条 β 链结合成的四聚体（$\alpha_2\ \beta_2$)，在胎儿则为两条 α 链和两条 γ 链结合而成的另一四聚体（$\alpha_2\ \gamma_2$)。抗成人血红朊抗血清内存在着一些对 α 和 β 链的专一抗体，不过只有当这两条多肽链位于天然分子上时，它们才能呈现出抗原性，和这些专一的抗体结合。再者，抗分离的 α 链的专一抗体能够识别游离的 α 链，和位于成人血红朊（$\alpha_2\ \beta_2$）四聚体内 α 链上抗原决定簇，但不能识别胎儿血红朊（$\alpha_2\ \gamma_2$）四聚体内 α 链上的抗原决定簇。显然，这是由于同一对 α 链当和 β 链结合时，与和 γ 链结合时其抗原专一性有所改变的结果（Reichlin 等，1966)。以上这些例子证明存在着依赖抗原四级结构的抗体，它们针对两个或更多亚基交界区域共同组成的构造，或者针对一个亚基和其它亚基相互作用引起的构象变化。

总之，蛋白质抗原的免疫原性和抗原专一性是基于暴露在大分子表面的各种决定簇的空间排列图式。进入体内的抗原绝大部分被酶解，至少总有一小部分存留下来，以完整的天然大分子形式和免疫活性细胞表面的抗原受体起作用。蛋白质抗原的专一性可能依赖分子的各级结构，因而同一抗原分子产生的抗体也可能是多种多样的。这就大大增加了研究蛋白质分子的抗原结构的复杂性。

天然蛋白质按其分子形状和构造的特点分为球蛋白和纤维蛋白两大类。酶、蛋白质激素、抗体以及细胞的大多数结构蛋白均属球蛋白。结缔组织蛋白，如胶原、角朊以及丝蛋白等属于纤维蛋白。这两类蛋白质的分子构造和抗原结构各具特点，现分述如后。

3. 球蛋白的抗原构造。决定簇的大小、数目和微细结构

如前所述，球蛋白抗原的免疫原性依赖于分子的完整性和表面决定簇的空间排布图式。至于所产生的每一种抗体的结合位点，却只能各自和抗原大分子表面的极小部位(抗原决定簇)专一地结合。

为了研究天然蛋白质抗原决定簇的大小和构造，通常采用类似前述半抗原竞争抑制抗原抗体反应的原理（图 1-2，13页)，即利用抗原的酶解片段来抑制该抗原和抗体的反应。如果抗体经某一片段处理后，失去或减小和原来抗原的结合能力，就说明这一片段和原来抗原的决定簇在构象上相似。再根据对这一片段的排列顺序的分析，就可以推测出决定簇的大小和结构。如果已知抗原分子的一级结构和空间构象，还可以进一步推测这些片段在分子上分布的位置。为了使片段和天然分子的某一部分相似，片段就应当具有足够大小才能呈现出有序的空间构象，或者和抗体相互作用时，因构象转化而适合于抗体

结合受体的空间构象。因此，用这种方法估测出的决定簇大小可能偏高，只能粗略地表示免疫活性多肽在分子上的分布的大致范围。用这种方法比较详细研究过的蛋白质有以下几种：白蛋白（Habeeb 等，1974）；核糖核酸酶（Brown，1962）；链球菌核酸酶（Omenn 等，1970）；肌红朊（Crumpton，1964，1965；Atassi，1973，1975）；溶菌酶（Atassi 等，1973）；TMV（Spitler 等，1970）等。其中以肌红朊和溶菌酶两个分子研究得最为透彻。现叙述如下，作为天然球蛋白分子抗原结构的代表：

（1）肌红朊（Myoglobin）

肌红朊是一种载氧蛋白质。精鲸肌红朊分子量为 18,400，由包含 153 个氨基酸残基的一条肽链折叠盘曲而成，无二硫桥，分子的立体构象的稳定性很大程度上是靠二级结构（α-螺旋构象约占 75%）和相邻侧链间的长距离分子力维持的。这是立体结构最先研究清楚的一个蛋白质分子（Kendrew 等，1961）（图 1-12）。随后不久，全部一级结构也弄清楚了（Edmundson，1965）（图 1-13）。这为研究天然蛋白质分子的抗原结构创造

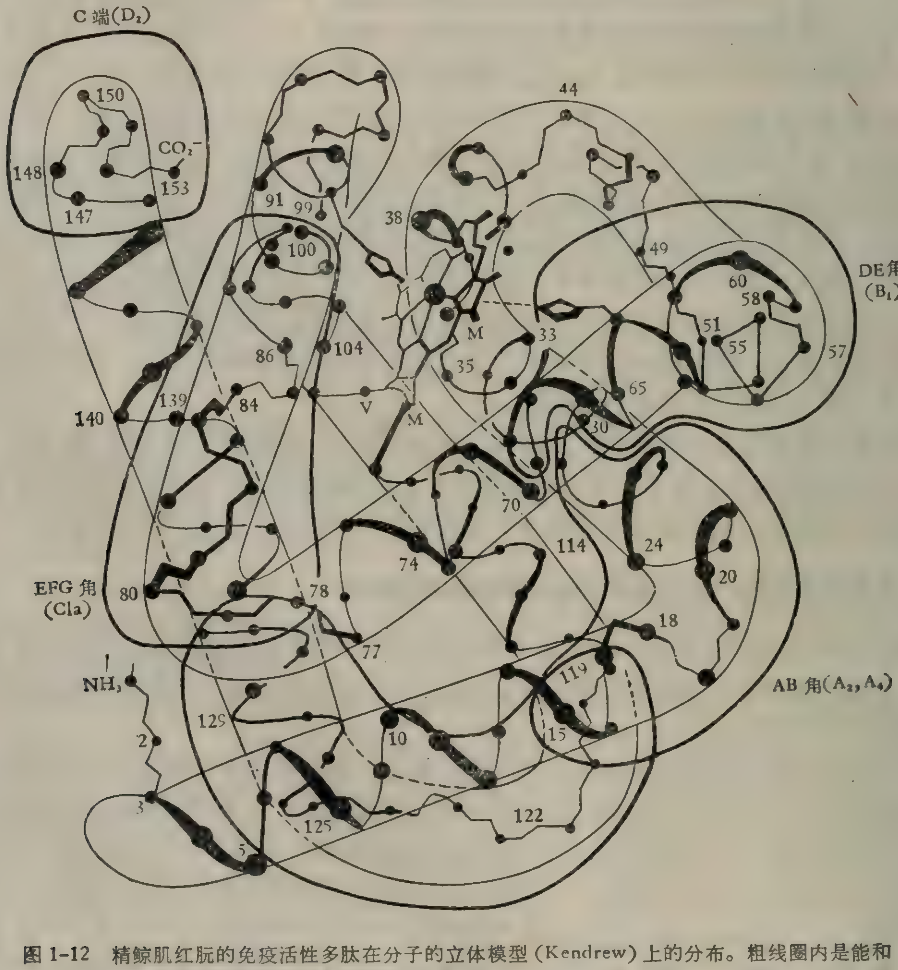


图 1-12　精鲸肌红朊的免疫活性多肽在分子的立体模型（Kendrew）上的分布。粗线圈内是能和抗肌红朊抗血清结合的酶解片段在分子上的位置(据 Crumpton 和 Wilkinson,1965；Atassi 和 Salpin，1968)。数目字系肽链的氨基酸排列顺序(据 Edmundson，1965，改绘)。

10 20
Val–Leu–Ser–Glu–Gly–Glu–Trp–Gln–Leu–Val–Leu–His–Val–Trp–Ala–Lys–Val–Glu–Ala–Asp–Val–
30 40
Ala–Gly–His–Gly–Gln–Asp–Ile–Leu–Ile–Arg–Leu–Phe–Lys–Ser–His–Pro–Glu–Thr–Leu–Glu–Lys–
50 60
Phe–Asp–Arg–Phe–Lys–His–Leu–Lys–Thr–Glu–Ala–Glu–Met–Lys–Ala–Ser–Glu–Asp–Leu–Lys–Lys–
70 80
His–Gly–Val–Thr–Val–Leu–Thr–Ala–Leu–Gly–Ala–Ile–Leu–Lys–Lys–Lys–Gly–His–His–Glu–Ala–
90 100
Glu–Leu–Lys–Pro–Leu–Ala–Gln–Ser–His–Ala–Thr–Lys–His–Lys–Ile–Pro–Ile–Lys–Tyr–Leu–Glu–
110 120
Phe–Ile–Ser–Glu–Ala–Ile–Ile–His–Val–Leu–His–Ser–Arg–His–Pro–Gly–Asn–Phe–Gly–Ala–Asp–
130 140
Ala–Gln–Gly–Ala–Mef–Asn–Lys–Ala–Leu–Glu–Leu–Phe–Arg–Lys–Asp–Ile–Ala–Ala–Lys–Tyr–Lys–
150
Glu–Leu–Gly–Tyr–Gln–Gly

图 1-13 精鲸肌红朊的一级结构 (Edmundson, 1965)。

了有利条件。

为了阐明肌红朊分子的抗原结构，Crumpton（1964，1965）最先研究了精鲸肌红朊胰糜蛋白酶酶解片段，对肌红朊和抗肌红朊血清沉淀反应的最大抑制量。结果发现至少有四个以上的片段，A_2(15—33)，A_4(15—29)，B_1(56—69)，C_{1a}(77—89)，和 D_2(147—153)，表现不同程度的专一的抑制能力(表 1-4)。 这说明它们的构象不同程度地符合天然肌红朊分子上相应的抗原决定簇的构象，更为可能的是这些片段和抗体相互作用时发生“构象转化”，而不同程度地适合于抗体结合位点的空间构象。另一些片段，如 D_3(1—7)没有免疫学活性。其原因或者可能由于这些酶解片段不能保持在完整分子上原有的构象；或者抗血清内不存在对抗这一部位的抗体。换句话说，这一部位在免疫学上是不活动的，不能引起抗体。把这些有免疫学活性片段和肌红朊分子的立体模型（Kendrew）对

表 1-4 肌红朊蛋白（Apomyoglobin）之胰糜蛋白酶解多肽片段的氨基酸排列顺序及免疫学活力

多肽	排列顺序	分子量	抗原抗体复合物沉淀之最大抑止(%)		
			抗血清WF与		抗血清 WH与肌红朊蛋白
			肌红朊蛋白	正铁肌红肌	
A_2	15 Ala–Lys–Val–Glu–Ala–Asp–Val–Ala–Gly–His–Gly–Gly–Asp 33 –Ileu–Leu–Ileu–Arg–Leu–Phe	2051	12		
A_4	15 Ala–Lys–Val–Glu–Ala–Asp–Val–Ala–Gly–His–Gly–Gly–Asp 29 –Ileu–Leu	1522	12	8	9
B_1	56 Lys–Ala–Ser–Glu–Asp–Leu–Lys–Lys–His–Gly–Val–Thr–Val 69 –Leu	1523	0	8	0
C_{1a}	77 89 Lys–Lys–Lys–Gly–His–His–Glu–Ala–Glu–Leu–Lys–Pro–Leu	1513	0		>7
C_2	70 76 Thr–Ala–Leu–Gly–Ala–Ile–Leu	657	0		
D_{1b}	139 146 Arg–Lys–Asp–Ile–Ala–Ala–Lys–Tyr	963	5		
D_2	147 153 Lys–Glu–Leu–Gly–Tyr–[Gln, Gly]	793	15	7	>6
D_3	1 7 Val–Leu–Ser–Glu–Gly–Glu–Trp	818	0	0	0

照起来研究，发现它们都靠近或正好位于折叠的多肽链的转角处，即分子表面外露最突出的地方。如 A_2(15—37)，A_4(15—29) 位于 AB 角，B_1(56—69) 位于 DE 角，C_{1a}(77—89) 位于 EFG 角，而 D_2(147—153) 相当于分子 C 端 7 肽，也是位于分子表面突出部位的(图 1-12)。胰蛋白酶酶解片段的研究也得到类似的结果。除去具免疫活性的片段 (17—31) 位于分子的 AB 角，片段 (79—96) 位于 EFG 角，以及 C 端 6 肽和上述胰糜蛋白酶酶解免疫活性片段在分子上的位置重合外，还出现一个新的免疫活性片段 (119—133) 位于 GH 角(图 1-14)。总之，根据这些结果可以粗略地描画出免疫活性片段在肌红朊分子上分布的大致范围(图 1-12)，并提示天然球蛋白分子的抗原决定簇可能位于分子表面的突出部位(肽链转角上)。不过抗原决定簇的大小可能要比这些片段的长度要小一些。为了更精确地定位，并了解其大小和微细结构，就必须配合使用其他方法。

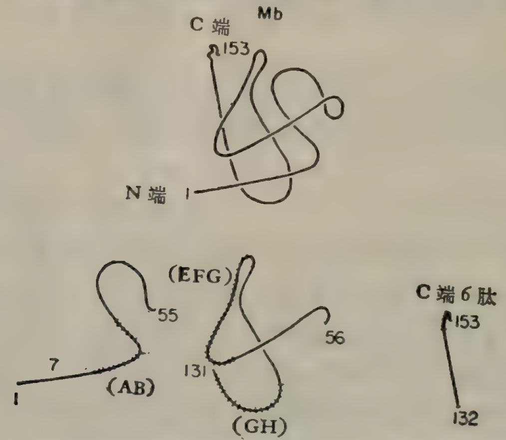


图 1-14 精鲸肌红朊肽链盘曲示意图。胰蛋白酶酶解片段实验证明抗原活性区位于片段 17—31(AB 角)，79-96(EFG 角)，119-133(GH 角) 和 C 端 6 肽。++++++++具抗原活性酶解片段(据 Atassi 和 Salpin，1968)。

对有免疫学活性的 C 端 7 肽片段 (-Lys-Glu-Leu-Gly-Tyr-Glu-Gly) [147 148 149 150 151 152 153] 更细致的酶解实验提示，它所包含的抗原决定簇的大小可能不超过 C 端 6 肽的大小 (Crumpton, 1967)。为了精确地限定这一抗原决定簇的范围，合成了 C 端一系列短肽 (7 肽、6 肽、5 肽和 4 肽)，并比较了它们的免疫学活性。结果发现 Lys (147) 不参与抗体反应，而 Gly(153) 则可能包含在决定簇内。其次，2 肽 (-Gly-Leu-) [148 149] 参与 C 端抗原决定簇的组成，而位于肽链转角处的 Leu(149) 尤其重要，可能是免疫学活性最强的优势基团。这更加有力地指明抗体不仅针对肽链的转角区域，而且还可能主要针对转角处的特定的一个氨基酸残基 (Crumpton, 1970)。

除一系列合成肽段的比较方法外，还可以系统地应用在特定的氨基酸残基处切断肽链，并结合个别氨基酸残基化学改性等方法，进一步研究抗原决定簇的大小和微细结构。当用溴化氰 (CNBr) 处理时，精鲸肌红朊分子在 Methio(55) 和 Methio(131) 处断开，得到三个片段，包含着原分子的 4 个抗原决定簇。片段 1—55 上存在其中一个抗原决定簇。这个抗原决定簇在这一片段上的精确范围如何呢？简图 1-15 表示精确地推定断片 1—55 上抗原决定簇范围的步骤，同时也可作为一个例子说明球蛋白的抗原决定簇精确

定位的一般方法（Atassi，1975）。实验和推理的步骤按图 1-15 上的顺序简述如下：

1）用化学改性方法，改变完整分子上 Methio-55，His-48，Arg-31 和 Tyr-7 残基，对免疫活性没有影响。由此可见，这些残基不位于抗原决定簇的范围内；

2）已知肽段 1—7 无抑制活性，而肽段 8—153 却保持完整分子的免疫学活性。因此，肽段 1—7 显然应位于抗原决定簇范围之外；

3）改变片段 1—55 上的 Arg-31 和 Arg-45 残基，对其免疫学活性没有影响；

4）已知肽段 35—42 无抑制活性。联系（c）一起考虑，提示顺序 31—45 很可能无免疫学活性；

5）肽段 17—31 有抑制活性，表明一个免疫学活性区域存在的大致范围；

6）肽段 1—55、1—36 和 1—31 具有相同的免疫学活性，提示肽段 31—55 不包含在抗原决定簇范围内；
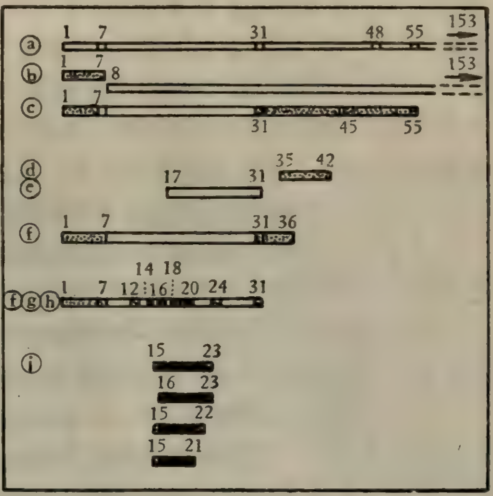


图 1-15　精鲸肌红朊片段 1—55 上抗原决定簇精确定位步骤示意图。抗原决定簇以外的肽段和残基用点表示；已证明为决定簇的一部用黑色表示；只对一些抗血清有免疫学活性的残基用斜线表示（据 Atassi，1975）。

7）改变片段 1—31 上的 His-12 和 His-24 或 Tyr-7 或 Tyr-14 都不影响免疫学活性；

8）另一方面，Lys-16 琥珀酰化，Glu-18（也可能 Asp-20）还原，则完全失活。改性的多肽测不出构象变化，显然它们的失活不是由于构象的改变。综合以上结果，抗原决定簇可能存在的范围便进一步缩小到顺序 12—23 之间了。

9）为了最后精确地确定抗原决定簇的范围，又合成了肌红朊顺序 1—55 内几个长短

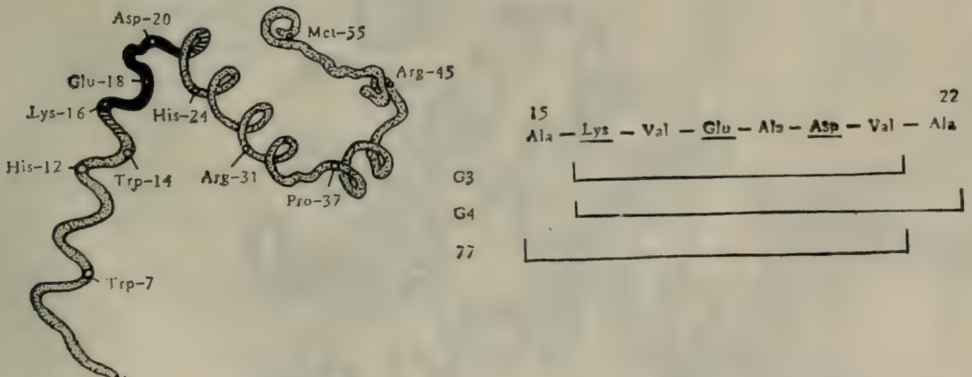


图 1-16　肌红朊的 1—55 肽段上抗原决定簇的精确定位及对抗血清的依赖。右图：对于不同的抗血清，抗原反应区的位置，大小和排列顺序。肽段 16—21 为 3 个抗血清（G3，G4，77）所共有的区域。对于 G4 和 77，抗原决定簇向右和向左延长一氨基酸残基。左图：这一抗原反应区在 1—55 肽段模型上的位置。实线段代表抗原反应区的共同部分（16—21 顺序）。其两侧的斜线相当于一个氨基酸残基，依抗血清而定，可能参与或不参与决定簇的组成（据 Koketsu 和 Atassi，1974）。

不同的肽段 15—23，16—23 和 15—21，并比较研究了这几个肽段和三种抗肌红朊抗血清之间的免疫学行为。结果发现，对于 G_3 抗血清(山羊)，抗原决定簇包括顺序 16—21(6 残基)，对于 G_4 抗血清（山羊）包括顺序 16—22 (7 残基)，而 77 抗血清（家兔）则包括顺序 15—21 (7 残基)(图 1-16)。因此，对于这三个抗血清，这一抗原决定簇总是都包含顺序 16—21。依抗血清的不同，某一侧还可能多一个氨基酸残基。于是，这一抗原决定簇便最后缩小到 6—7 氨基酸残基的范围。理论上也正好相当于抗体结合位点的大小。从完整的天然肌红朊看来，这正好是位于分子的 AB 角，表面最突出的地方(图 1-12)。

总之，照此办理，如此法一步步地确定其他几个片段的抗原决定簇范围，综合起来便可以得出整个肌红朊分子的全部抗原结构（Atassi, 1973; 1975）。

这里还要指出上述最后一个实验的理论意义在于说明，对于天然球蛋白的同一抗原决定簇，不同物种或个体产生的抗体的结合位点都能识别一个包括 6—7 氨基酸残基的共同区域，其范围相当恒定，只有一个残基的出入。换句话说，免疫活性细胞对抗原的识别机制是很精确的。不同物种或个体产生的抗体基本上针对抗原分子表面同一恒定的区域。正因为如此，蛋白质大分子抗原结构分析，才有规律可循，不致因抗血清不同得到的结果也不同（Koketsu 和 Atassi, 1974）。

Atassi 实验室系统地应用上述几种方法，经过近十年的努力，基本上弄清楚了精鲸肌红蛋白分子的全部抗原结构（Atassi, 1973; 1975）(图 1-17)。主要结果可简单地归纳为以下几点：

1) 天然精鲈肌红蛋白分子含有 5 个抗原决定簇。各决定簇肽段的排列顺序如下：

决定簇 1：(Ala)-Lys(15)-Val-Glu-Ala-Asp-Val(21)-(Ala) 6（或 7）残基

决定簇 2：Lys(56)-Ala-Ser-Glu-Asp-Leu-Lys(62) 7 残基

决定簇 3：Ala(94)-Thr-Lys-His-Lys-Ile-pro(100) 7 残基

决定簇 4：His(113)-Val-Leu-His-Ser-Arg-His-Pro(120) 8 残基

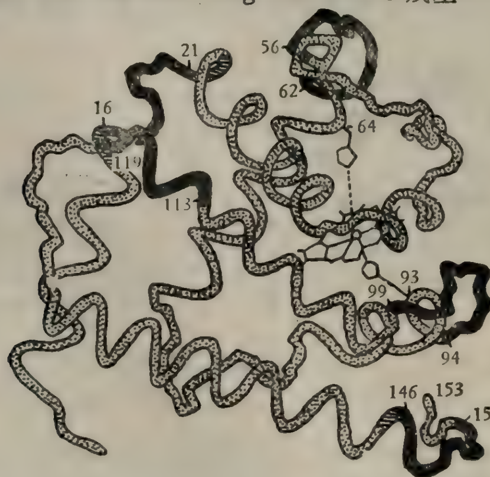


图 1-17 精鲸肌红蛋白的三维结构简图，示肽链折叠和抗原构造。抗原活性区域用黑带表示。斜线，每一段只相当于一个氨基酸残基，对于某些抗血清可能参加抗原活性区的组成。有点的部分代表无抗原活性的区域(据 Atassi, 1975)。

决定簇 5：(Lys)[145]-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-Tyr[151] 6（或 7）残基

从分子的三维结构模型（图 1-12，图 1-17）上可见，决定簇 1（15—21）位于分子的 AB 角上；决定簇 2（56—62）位于 DE 角上；决定簇 3（94—100）位于 FG 角上；决定簇 4（113—120）位于 G 螺旋末端和 GH 角处；决定簇 5（145—151）位于 H 螺旋末端和非螺旋的 C 端 5 肽。

2）由前一段可见，抗原决定簇的大小，不超过 6—8 个氨基酸残基，并有明确的界限。对于不同的抗血清，变动范围只有 ±1 氨基酸残基。这和抗体的结合位点的大小是符合的。它们分布在分子表面确定的位置，即肽链转角处或末端等分子表面外露最突出的地方。决定簇的大小和位置使它们易于和抗体的结合位点接近并与之结合。从图 1-17 可见，决定簇 3 和决定簇 5 在空间地位上彼此很靠近。可以设想，它们可能共同构成一个特定的空间图式而和免疫活性细胞表面受体相互作用。这也许可以部分地解释，何以在初级抗体反应（至少其早期的抗体）中，需要保持天然分子完整的三维结构的原因。

3）天然肌红朊分子之抗原决定簇的数目是有限的。虽然存在 5 个抗原决定簇，但由于空间障碍，在平衡时能和抗原表面结合的抗体分子数目平均不超过 4 个。

4）构成抗原决定簇的氨基酸的类型，主要是极性氨基酸。4 个决定簇含 Lys；1 个含 Arg；3/5 决定簇含 Asp 或 Glu，或同时兼有二者；2 决定簇含 His。因此，抗原决定簇和抗体的结合位点之间的相互作用，主要是极性性质的。非极性氨基酸则可能通过氢键或疏水性相互作用起稳定作用。以上这些结论（至少前三点）或许对其他球蛋白抗原也有普遍的意义。

（2）溶菌酶（Lysozyme）

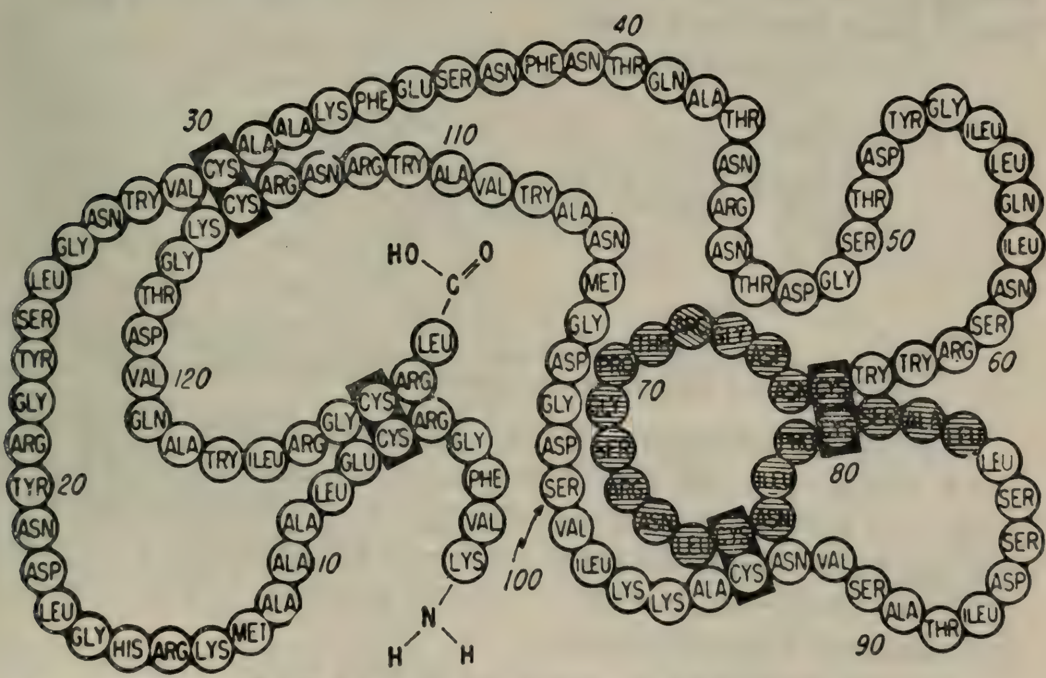


图 1-18　鸡蛋清溶菌酶之氨基酸排列顺序。“环形”多肽区用横线表示（据 Sela，1969）。

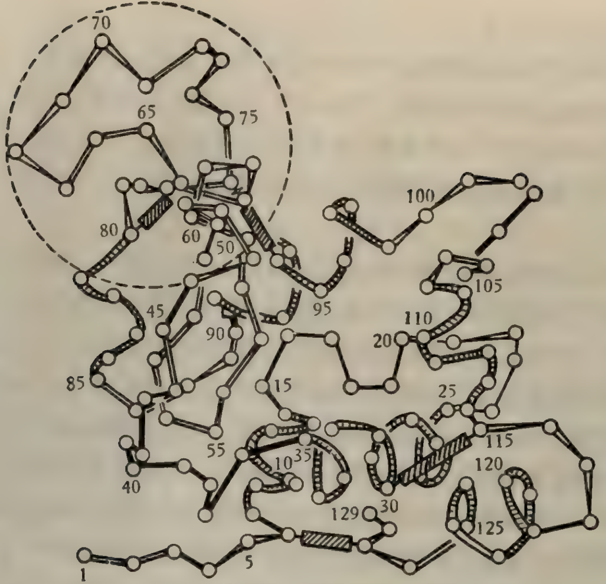


图 1-19　鸡蛋清溶菌酶肽链骨架构象简图。虚线圈内为"环肽"(据 Blake 等,1965)。

溶菌酶(鸡蛋清)是分子量为 14,300 的碱性蛋白质。分子由一条包含 129 氨基 酸 残基的多肽链,靠四个二硫桥相连成"紧密的"球形构造。它的一级结构 (Jolly 等, 1963, 1965)(图 1-18)和立体结构(Blake等, 1965; Phillips, 1967)都已经弄清楚了(图 1-19)。

用 CNBr 处理溶菌酶时,分子在 Meth-12 和 Meth-105 两处断开, 但四个二硫桥未受破坏,仍能保持 70% 的免疫学活性(图 1-20)。 这表明分子的天然构象主要是 靠 二硫桥维持的。只要这些二硫桥不被破坏,多肽链虽在两处被切断,仍能在相当程度上保持原来分子的构象 (Bonavida 等, 1969)。

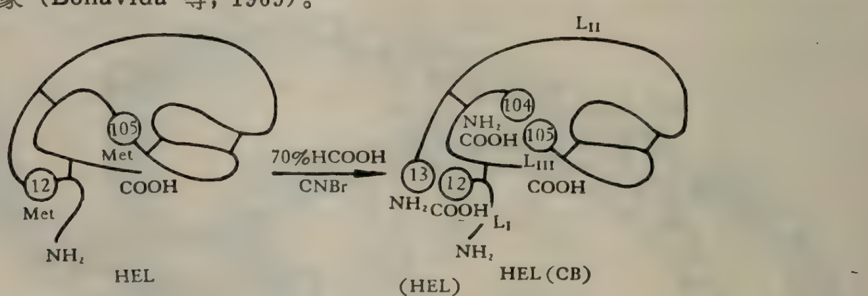


图 1-20　溶菌酶(鸡蛋清)分子及经过 CNBr 处理的产物 [HEL(CB)] 的结构简图。 HEL分子在 Met12 和 Met105 位置断开,HEL(CB) 仍保持四个二硫桥(据 Bonavida 等, 1969)。

酶解片段的研究证明溶菌酶分子存在两个大的具有免疫学活性的片段:肽 段 (57—107) 被 Cyst-64 和-80 以及 Cyst-76 和-94 之间的两个二硫桥连接起来;肽段 (1—27 和 122—129) 被 Cyst-6 和-27 之间的二硫桥连接起来。从溶菌酶经胃蛋白酶酶解的片段中,分离出的 B 多肽 (62—96),包含着分子的一个主要的抗原决定簇。 B 多肽实际上是三个酶解片段 (62—68), (74—83) 和 (84—96) 被 64 和 80, 76 和 94 之间的两个二硫桥连接起来的,其结构如图 1-21 所示。

后来, 进一步证明此片段内, (64—83) 区域(包含有 Cyst-64 和-80 间的二硫桥),

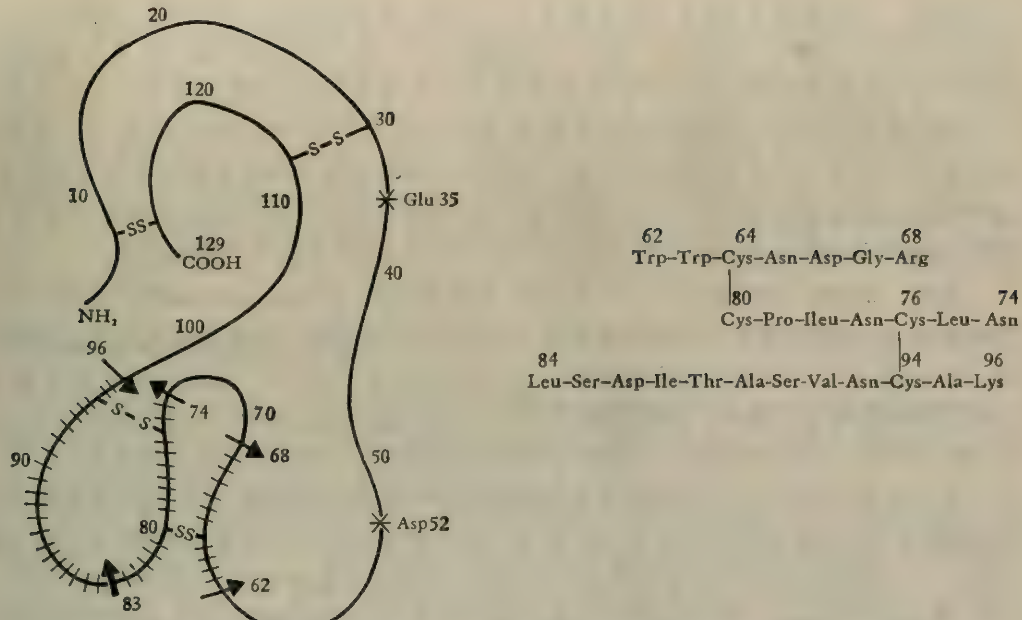


图 1-21 溶菌酶(鸡蛋清)分子简图,示有免疫学活性的胃蛋白酶酶解片段在分子上的位置。(++++)免疫活性片段;(——>)酶作用点;＊溶菌酶之酶活力中心(据 Shika 等 1967)。

即所谓“环肽”(“loop” peptide),是溶菌酶分子的主要抗原决定簇(图 1-18)。从天然溶菌酶分子的三维模型可见(图 1-19),“环肽”位于分子表面突出的角上。这是和前述肌红朊上得到的结论是一致的。

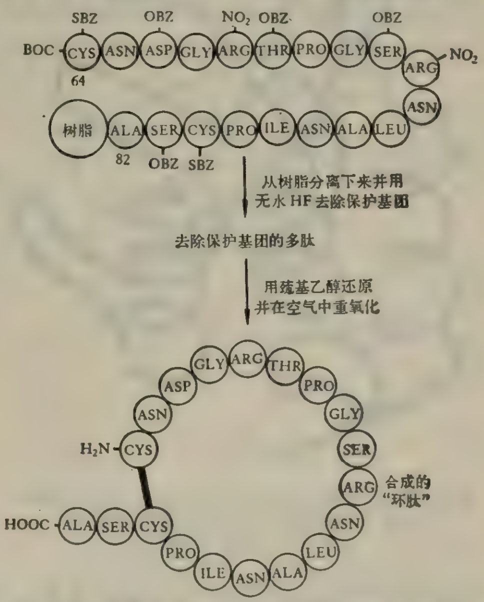


图 1-22 溶菌酶“环肽”(64—82)固相合成示意图。Cys-76 被 Ala 置换,Gly-67 放射性同位素标记(据 Arnon 等,1971)。

从溶菌酶分离的“环肽”和多聚-D,L-丙氨酸叉链结合后引起的抗体,能和天然的溶菌酶和分离的“环肽”同样专一地结合。其次,用免疫吸附剂能分离出抗溶菌酶“环肽”的专一抗体。这种抗体和天然溶菌酶之间的反应可被“环肽”专一地抑制。如果“环肽”的二硫桥被氧化,再羧甲基化,环被打开成为开链之后,就失去抑制能力了。因此,抗“环肽”抗体是针对一个依赖构象的抗原决定簇的。同时,这也清楚地说明了决定簇的构象和专一性的密切关系(Arnon, 1968; Arnon 和 Sela, 1969; Maron 等, 1971; Sela, 1972)。

如上所述,鸡蛋清溶菌酶的“环肽”(64—82)是一个构象决定簇。最近,Sela 和 Anfisin合作用固相法合成了这一“环肽”,并把它连结到叉链多聚-D,L-丙氨酸上,得到第一个含有天然蛋白质的抗原决定簇的全人工合成抗原(图 1-22)。用这种全合成抗原免疫动物,产生的抗体能和原来溶菌酶分子的一定部位专一地结合,而且同样地依赖于决定

簇的构象。"环"被打开后,专一性就改变了。Sela 实验室还进一步合成了"环肽"的几种结构类似物(Sela, 1972),发现75位置的 Leu 或78位置的 Ile 被 Ala 置换时,对抗原性没有什么影响。然而,当79位置的 Pro 被置换时,抗原性就显著降低。如果两个 Arg 残基(68和73位置)被 Ala 置换,就完全失去和专一抗体结合的能力。这证明有可能人工合成一个大分子抗原,它能引起针对天然蛋白质之特定的构象决定簇的抗体。这一实验的重要意义在于如果对一种酶是可能的,理论上对其他已知排列顺序的病毒和细菌的抗原决定簇也应有此可能。这就为"人工合成疫苗"开辟了广阔的前景。

最近,Atassi 实验室采用一个新方法,用柠康酸酐 (Citraconic anhydride) 可逆地保护氨基,使溶菌酶易于在精氨酸肽键处切断,得到有完整二硫桥的免疫学活性非常高的三个肽段,几乎包含分子的全部抗原活性 (Atassi 等, 1973)。这就为研究溶菌酶的全部抗原构造准备了条件。顺便要提到,同一方法也成功地应用到牛血清白蛋白 (Habeeb 等, 1974)。这一方法也许在分析球蛋白的抗原结构上是有广泛应用价值的。

除上述两个例子以外,对链球菌核酸酶的酶解片段的研究发现,抗原性分布在两个区域,即顺序(6—48)和顺序(99—149)区域。前一区域包含一个抗原决定簇,可能限于顺序(18—47)范围内。后一区域包含两个决定簇,可能限于顺序(99—126)和顺序(127—149)范围内 (Omenn 等, 1970)。从图1-23可见,这些抗原决定簇也是位于肽链转折处,球蛋白分子表面突出的地方。因此,从以上几个例子看来,对于球蛋白分子,抗原决定簇位于分子表面突出的部位,很可能是有普遍性的。

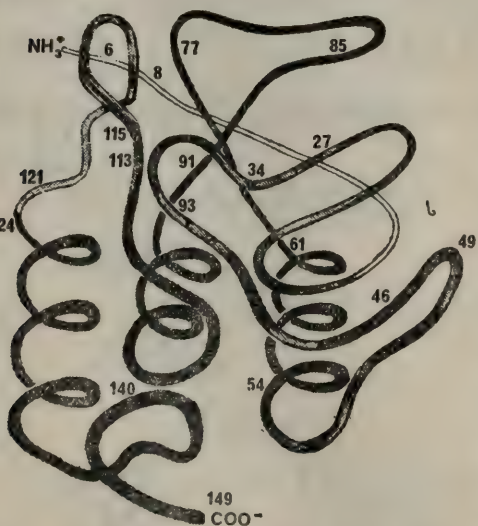


图 1-23 链球菌核酸酶分子多肽链构象的平面图。根据 X-射线晶体构造模型绘制,正面观(据 Arnon 等,1971)。

总之,从以上几个典型例子的研究结果可以得出对于球蛋分子的抗原构造有一般理论意义的看法。球蛋白分子的免疫原性和抗原专一性是基于暴露在大分子表面的抗原决定簇的特定化学构造、数目和排列图式。决定簇的数目依赖于抗原分子的表面积、表面构造的多样性、决定簇的大小以及免疫活性细胞的识别能力。有材料指示,在抗体过量时,由于空间障碍一个肌红朊分子可能结合的抗体最大数目为3—4个分子,虽然已知它有5个抗原决定簇。由于同样的原因,其他球蛋白有效决定簇的数目可能同样是很有限的。在肌红朊、溶菌酶和链球菌核酸酶分子,这些决定簇倾向于分布在肽链转角处或末端,分子表面外露最突出的地方。抗原决定簇的专一性不仅依赖其氨基酸组成和顺序,而且还依赖局部的构象(如"环肽"),以及分子其余部分对此局部构象的影响(如变构作用对分子构象的影响)。因此也可以说,免疫活性细胞所识别的是球蛋白分子表面的局部构象。由于球蛋白的极性侧链主要分布在分子表面,而非极性基团多埋在分子的内部 (Perutz 等, 1965)。例如,精鲸肌红朊外露在分子表面的120个氨基酸残基,在中性条件下,其中76个氨基酸是极性的,而43个是非极性的;并且这43个被当作位于表面的非极性基团,其

实也是位于接近表面的凹陷处，由于空间阻碍实际上难于和抗体结合。如果球蛋白的抗原决定簇主要是极性基团组成的，那么就可以推测球蛋白抗原和同型抗体之间的结合或许可能主要是靠静电相互作用和氢键。最后，肌红朊的抗原决定簇的大小有明确的界限，不超过6—8个氨基酸残基的范围。这对于其他球蛋白可能同样是适用的，并且也和其他半抗原决定簇的大小是相近的。由于一个球蛋白大分子上的抗原决定簇的数目和大小是有限的，因此可以把它们看作是半抗原决定簇，而把分子表面的其余部分看作是载体，各自和不同种类的淋巴球相互作用。这一概念对于了解球蛋白的免疫原性和抗原构造的关系是很重要的。

4. 纤维蛋白的抗原构造。胶原

胶原是结缔组织的一种主要成分。由于其特殊的化学结构，以及胶原病是临床上常见的自身免疫性疾病，胶原的抗原构造的研究颇受重视。同时，胶原作为纤维蛋白的代表，其抗原构造的研究，在理论上也有意义。

天然可溶性胶原分子是由三条多肽链盘绕成的一根三股螺旋。每条多肽链的长度约为1,050氨基酸残基。三条多肽链中，两条（$\alpha1$）链的排列顺序是相同的，另一条（$\alpha2$链）则不相同。在天然分子内，三条多肽链都具有左旋螺旋构象（二级结构），它们一起又盘绕成一根三股的超螺旋（三级结构）。这种空间构象的特点是由特殊的一级结构决定的。每条α链都呈现三联体（-Gly-x-y-）周期性，即每逢第三个氨基酸残基的位置都是Gly，其余两个位置（x,y）可能是其它任何的氨基酸。由于这种特殊结构，两条$\alpha1$链和一条$\alpha2$链才能紧密地嵌合成一根三股的超螺旋结构。同时，和球蛋白不同，胶朊多肽链氨基酸残基的侧链全朝向分子外面。胶原的这种独特的空间结构主要是靠氢键维持的，因而易受破坏（如轻微加热），出现蛋白质的变性。变性的胶原，几条α链各自拆开，伸展，失去原有的构象而呈混乱的线团状。这一变性过程在一定程度上是可逆的。占α链全长约97%的部分都参与三股超螺旋排列，而α链两端约15—20氨基酸残基的小段肽链却不具有（-Gly-x-y-）周期性结构，因而不参与三股超螺旋构造。这些位于α链两端的非三股超螺旋的部分较中间部分更易于被酶解（Traub 和 Piez, 1971）。关于胶原的抗原结构的一般知识可参看Benjamini的综述（1972）。

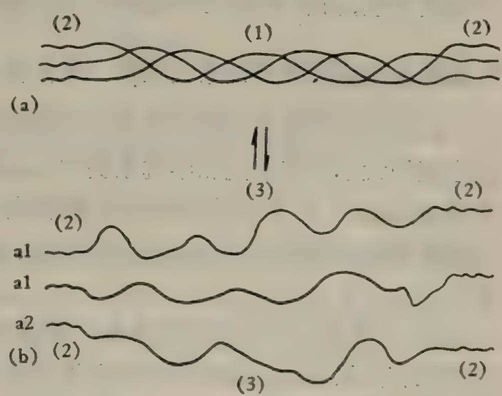


图 1-24 天然和变性胶原的构造模型及三种不同类型抗原决定簇简图。(a) 天然可溶性胶原。(b) 变性可溶性胶原。抗原决定簇的类型：(1) 螺旋—依赖构象，对蛋白酶不敏感；(2) 末端（非螺旋）—不依赖构象，对蛋白酶敏感，交叉反应低；(3) 中心（变性时露出）—不依赖构象，蛋白酶不敏感，交叉反应高（据 Beil 等，1973）。

天然和变性胶原明显不同的结构（三股超螺旋和乱线团构象），以及α链中段螺旋部分和两端无螺旋部分的结构区别，在免疫学上表现为三种不同类型的抗原决定簇（图1-24）。利用不同物种（大鼠、家兔和鸡）的抗血清可帮助区分这几类不同的抗原结构。大鼠抗胶原血清能够识别依赖完整分子的三股超螺旋构象的抗原决定簇，称为螺旋抗原决定

簇(Helical antigenic determinant)。这种抗血清只能和天然分子起反应，变性时这种抗原专一性就消失了。只有当分离的α链恢复分子天然构象，即复性时，抗原活性才又可以明显恢复。鸡抗胶原血清中，除去具上述抗原专一性的抗体外，还存在另一类能和变性胶原起强的交叉反应的抗体。经过免疫吸附分离的第二类抗体和变性胶原的反应甚至比和天然分子的反应还要强。用变性胶原免疫时，主要产生第二类抗体。第二类抗体的专一性是针对位于胶原分子中段的在分子变性时才露出来的中心抗原决定簇(Central antigenic determinant)。中心和螺旋抗原决定簇都同位于胶原分子的中段，但彼此的交叉反应很弱。这假定是由于螺旋抗原决定簇的专一性要求天然分子的氨基酸残基固定的空间排列，或者α1和α2链的共同参与，也就是说依赖于完整分子的天然构象，即所谓的构象决定簇；而中心抗原决定簇的专一性则要求在天然分子中被掩盖了的多肽链骨架，或α链的柔曲性，换句话说，不依赖于完整分子的天然构象。抗中心抗原决定簇抗体表现很强的种间交叉反应，而抗螺旋抗原决定簇抗体则没有。最后，还存在抗末端抗原决定簇(Terminal antigenic determinant)的抗体。这种抗体的专一性是针对α链两端的非螺旋排列顺序，只有在家兔抗血清中才能找到。它能和天然分子、伸展的α链和CNBr裂解的小断片同样地起反应。因此，这些抗原构造是不依赖构象的顺序决定簇(Beil 等，1973)。

总之，脊椎动物的胶原由于其特殊的分子结构，同时存在着构象决定簇和顺序决定簇。前者位于分子中段的螺旋区域，后者位于分子两端的非螺旋区域。胶原能与具有(L-Pro-Gly-L-Pro)n顺序和三股超螺旋构象的合成多肽起交叉反应，也支持构象决定簇的存在(Borek 等，1969)。进化过程中，螺旋区域氨基酸排列顺序的保守性比两端非螺旋区域要大，不过仍然存在物种之间的构造差异。和脊椎动物的胶原不同，人蛔虫(Ascaris lumbricoidis)的胶原似乎只存在顺序决定簇，因为其还原和羧甲基化的衍生物的抗原性，仍然和天然蛔虫胶原一样(Michaeli 等，1972)。

5. 和细胞免疫有关的抗原决定簇。载体决定簇

前面讲述的都是和循环抗体(体液免疫)起反应的抗原决定簇的构造。如前述，这些决定簇的大小和特性是和半抗原决定簇相似的。许多证据表明它们本身并不一定和细胞免疫有关系。和T细胞表面抗原受体反应的决定簇很可能或者只相当于这些决定簇的一部分或者是抗原分子上的其余部分(载体决定簇)。支持这种看法的主要有两方面的证据：

1）天然蛋白质和变性蛋白质之间，以及某些在构造上有关系的蛋白质之间，对体液抗体没有交叉反应，而对细胞免疫(迟发型超敏反应、巨噬细胞迁移抑制和刺激淋巴细胞转化等)则可能有广泛的交叉反应。如胰岛素的羧甲基化B链和抗胰岛素抗体无交叉反应，而能对用胰岛素致敏的豚鼠引发迟发型超敏反应(Clark 和 Menroz，1970)。天然溶菌酶和还原、羧甲基化溶菌酶之间也是这样。一些在结构上有关联的蛋白质，如天然鸡蛋白溶菌酶和天然牛乳白蛋白，人蛔虫的胶原和哺乳动物的胶原之间没有体液抗体交叉反应，而有广泛的细胞免疫交叉反应(Maron 等，1972；Michaeli 等，1972)。因此，对于体液抗体的反应专一性，蛋白质天然构象的完整性是必要的，而对于细胞免疫反应则似乎是不必要的。换句话说，和细胞免疫有关的决定簇(可能是载体决定簇)似乎对构象的

依赖程度较小。

2）载体决定簇和半抗原决定簇有实际的分界。

胰升血糖素（Glucagon）是一个包含29个氨基酸残基的多肽激素：

His–Ser–Gln–Gly–Thr–Phe–Thr–Ser–Asp–Tyr(10)–Ser–Lys–Tyr–Leu–Asp–Ser–

Arg–Arg–Ala(20)–Gln–Asp–Phe–Val–Gln–Trp–Leu–Met–Asn–Thr(29)

（据 Bromer 等，1957）

有证据提示其载体决定簇和半抗原决定簇，分别位于分子的不同部位。体液抗体的决定簇位于分子N端一半的肽段（1—17）；而C端的肽段（18—29）主要和细胞免疫专一性有关。不过，这种区别并不是绝对的，C端仍可与某些体液抗体反应（Senyk 等，1971，a，b）。

最后还应提到，无论纤维蛋白、球蛋白或变性球蛋白和体液抗体反应的抗原决定簇的数目是很有限的，在抗原分子上的分布也是间隔的。可是，细胞免疫反应有关的决定簇在分子上的分布可能比体液抗体决定簇更密集，并且可能是连续分布的。这方面的知识主要是用巨噬细胞迁移抑制法研究神经纤维的髓鞘碱性蛋白质的抗原构造得到的。

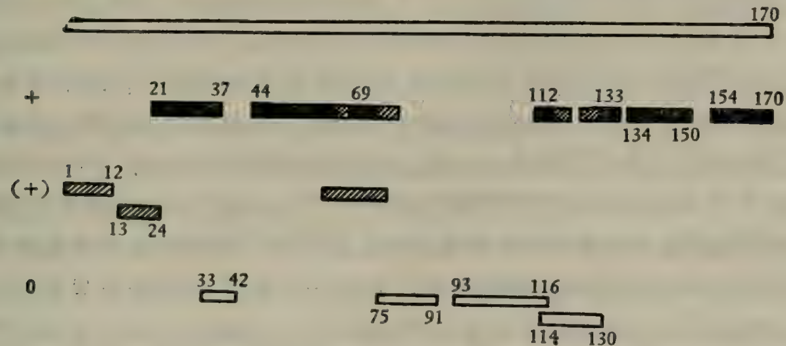


图1-25 与T细胞表面抗原受体相互作用的区域在牛脑脊髓炎蛋白（碱性蛋白）上分布示意图。上方空白线段示整个蛋白分子（170残基），黑色实线段示和致敏豚鼠的淋巴球温育时能抑制巨噬细胞迁移的片段。虚线段示此区域内的一个抗原决定簇的可能的位置，但尚未肯定。下方空白线段示免疫不活动区域（据 Bergstrand，1973）。

髓鞘碱性蛋白质（分子量约为18,500）可能是一条伸展的多肽链，其抗原性只依赖其一级结构。用巨噬细胞迁移抑制法测定其抗原构造，发现和T细胞表面抗原受体起反应的决定簇的分布，如图1-25所示，至少有8个决定簇。实际上整个分子就象由一串专一性不同的决定簇，首尾相连而成，其间只为少数免疫静止区分隔（Bergstrand，1973）。这和分子量相近的球蛋白和伸展的分子（如肌红朊、氧化核糖核酸酶）比较起来，决定簇的密度显然高得多。不过，这种情况是否有普遍性，还有待进一步的研究证实。总之，和细胞免疫有关的决定簇的研究还刚开始，对这方面的了解还是很粗浅的。

（二）蛋白质免疫原性的分子基础

抗原的免疫原性是诱导免疫反应，即产生专一的体液抗体和（或）细胞免疫的能力。对

于有反应能力的动物，一个蛋白质免疫原引起免疫反应的能力决定于一系列因素，如外源性、分子的构造和大小、物理状态、分解代谢速度以及注射剂量、途径和佐剂的性质等。这里只着重讨论免疫原的构造，即外源性、分子大小、聚集状态以及构象等因素和免疫原性的关系，包括免疫反应的类型(体液抗体或细胞免疫，以及产生的抗体的类别)和免疫原分子构造的关系。

关于免疫原性的现代概念，在很大程度上是受到免疫反应中两类细胞协同作用理论的影响而发展起来的。对于大多数免疫原，为了产生最适量的抗体，需要来源于胸腺的T淋巴球(简称T细胞)和来源于骨髓的B淋巴球(简称B细胞)的协同作用，巨噬细胞也可能参与这一相互作用。T细胞本身并不产生体液抗体，然而却是激活B细胞，使其增生、分化并合成免疫球蛋白所必需的。另一方面，发现一些具有重复决定簇的多聚体抗原，如细菌鞭毛、血兰朊等，不需要T细胞存在，就能直接激活B细胞产生抗体。这表明T细胞的合作对于激活B细胞并不是必不可缺的，而只是起一种辅助的作用。并且，还提示对于诱导B细胞的分化，在抗原和B细胞表面抗原受体之间可能需要比较高的亲合力或交叉连接，也就是要求抗原具有专一性相同的重复决定簇或多价性。载体效应的发现使能进一步假定，T细胞表面抗原受体主要和免疫原的载体决定簇相互作用，而B细胞表面抗原受体则和半抗原决定簇相互作用。T细胞和B细胞如何协同作用的机制还不太清楚，目前存在几种假说。其中最简单的是抗原集中假说，免疫原通过其载体决定簇和T细胞表面抗原受体结合而被集中在T细胞表面(或经过T细胞因子，IgT的中介而集中在巨噬细胞表面)，再由T细胞(或巨噬细胞)把一群专一性相同的半抗原决定簇提供给B细胞表面的抗原受体，激发B细胞的分化和合成抗体(参看第十三章，第424页)。

如果上述T和B细胞协同作用的理论是对的，于是就诱导体液抗体形成而论，免疫原性就可以看作是载体决定簇和半抗原决定簇各自和T"辅助"细胞和B细胞相互作用能力的总和，它们又可能各自独立地起作用。从另一方面看，也就是说T细胞和B细胞表面的抗原受体各自对免疫原的决定簇有不同的结构上的要求。因此，根据这种细胞协同机制对免疫原分子结构的要求，就应包括抗原决定簇的数目，是否有专一性相同的重复结构、是否同时表现半抗原和载体功能，以及决定簇间的排列和间距等方面。同时，免疫原分子结构在上述几方面的不同，可能影响免疫原和两类淋巴球相互作用的关系，从而改变免疫反应的类型——体液抗体、细胞免疫或免疫耐受性。免疫原的分子结构及其改变与免疫反应类型的关系是当前受到很大注意的问题。

1. 分子的大小和抗原构造的复杂性

抗原的免疫原性和分子大小有密切的关系。现在已知能引起免疫反应的最小的天然多肽是胰脏的一种激素升血糖素(Glucagon)(分子量=3,480)。其次是胰岛素(分子量=5,734)。核糖核酸酶(分子量约14,000)加佐剂是相当好的免疫原，不加时就弱。分子量超过40,000的可溶性球蛋白，如卵白蛋白通常是很好的免疫原。病毒外壳(如TMV)，细菌鞭毛和血兰朊等大分子的多聚体(分子量>1,000,000)有更强的免疫原性。然而，角朊和其它不溶的纤维蛋白，虽有很大的分子量却无免疫原性。一般说来，可溶性球蛋白都是好的免疫原，不溶性纤维蛋白则无免疫原性。足够大小的分子量(>10,000)，对于天然蛋白质似乎是有明显免疫原性的重要条件。不过，最近对一些人工合成多肽衍

生物的研究发现，分子量低达 500—1,000（甚至更低），在一些情形下也有免疫原性。

细菌鞭毛（长几微米，直径=20—50 毫微米）是由无数个亚基（鞭毛素，分子量≑30,000—40,000），靠非共价键首尾相连而成的高度复杂的构造（图 1-26）。鞭毛经酸处理后，降解为由相同亚基组成的大小不等的片段，提供了研究分子量和免疫原性关系的好材料。Nossal 等（1964）将鞭毛、鞭毛素多聚体（含 300 亚基）和鞭毛素单体（分子量=30,000），注射到大鼠足掌。然后用细菌制动法测定 IgM 和 IgG 抗体产生过程。随着免疫原分子量的不同，产生的抗体量和种类都有所不同。前两种免疫原，均含有重复的抗原结构，能引起 IgM 抗体形成，继之持续地产生 IgG 抗体。鞭毛素单体则几乎不能引起IgM 抗体，并且 IgG 抗体的高峰也比前二者低。在抗体量的方面，引起 IgM 抗体初级免疫反应的能力，鞭毛比多聚体要大 100 倍。引起 IgG 抗体的能力，鞭毛比多聚体大 100 倍，比单体大 1000 倍。（图 1-27）。在这个抗原系统里，清楚地看出分子量的大小和免疫原性（产生的抗体的量和类别）有一定的关系。

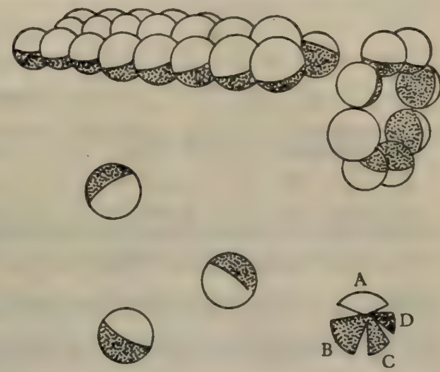


图 1-26 简图示鞭毛素分子排列成多聚体鞭毛素颗粒。每一个圆球代表一个单体分子，鞭毛素。图上方可见三行相邻排列的鞭毛素分子（每一个多聚体颗粒是这样 8 行分子构成的），以及多聚体颗粒末端的上面观。每一圆球的亮区代表鞭毛素分子外露到溶液中的部分，暗区代表与相邻分子毗连的部分，或朝向内面的部分。图下方可见三个游离的鞭毛素分子和一个溴化氰裂解成 4 个片段（A，B，C，D）的分子。在多聚体内，分子朝外的部分主要是A片段，已证明它含有鞭毛素分子的抗原活性（据 Nossal 和 Ada，1971）。

Parish 和 Ada（1969）进一步把一种沙门氏菌（*S. adelaide*）的鞭毛素（分子量≑40,000）用溴化氰裂解为四个片段："A" 片段最大（分子量≑18,000）仍然有免疫原性，而其它三个较小的片段对大鼠和家兔都没有免疫原性。"A" 片段诱导初级抗体反应的能力比鞭毛素原来的分子低很多，不过诱导次级反应的能力仍相差不多。此外，大鼠每天注射 "A" 片段，连续数周，就会产生对鞭毛素单体或多聚体相当显著的免疫耐受性，而鞭毛素或鞭毛素多聚体都不能诱导免疫耐受性（表 1-5）。因此，鞭毛素分子在局部降解过程中，免疫原性不但在量上而且在质上发生改变，从强的免疫原性转变到诱导耐受性的性质。

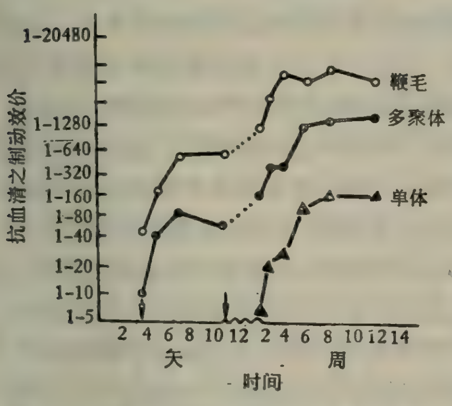


图 1-27 大鼠注射鞭毛、多聚体及单体（10 微克）后之免疫反应（据 Ada，等，1963）。

用 ^{131}I 标记鞭毛抗原的实验证明，鞭毛被阻留在腘淋巴结内的量比鞭毛素单体要多。用同样方法比较鞭毛素单体和 "A" 片段的分布，发现 ^{131}I 标记的 "A" 片段在淋巴结内的分布和纤毛素原分子的分布有所不同，前者位于淋巴结髓部巨噬细胞内很少，而在淋巴滤泡内较高。因此，推想聚集在髓部的抗原可能参与诱导抗体形成和免疫记忆，而位于淋巴滤泡的抗原可能诱导免疫耐受性，或者激发已经受过免疫刺激的细胞发生次级反应。至

表 1-5 鞭毛素多聚体，鞭毛素和片段 A 在成年和新生大鼠诱发抗体反应和耐受性的能力的比较

物质	分子量	诱发抗体形成的能力(成年大鼠)		诱发高剂量区耐受性的能力	
		初级反应	次级反应	新生	成年
鞭毛素多聚体	(40,000)ₙ	+++	+++	+	−
鞭毛素	40,000	++	+++	++	−
片段 A	18,000	±	++	+++	++

(据 Parigh 和 Ada, 1972)。

于片段 B, C, D 在淋巴结内很少阻留，因而不能引起任何免疫反应。这种因分布上的差别而造成的免疫反应类型上的差别，显然可能和它们的分子大小，以及由分子大小决定的抗原结构的复杂性有关系 (Parish 和 Ada, 1972; Nossal 和 Ada, 1971)。

鞭毛抗原的一个显著特点是不需要 T 细胞的辅助就能直接刺激 B 淋巴球产生体液抗体。血兰朊、肺炎球菌多糖、细菌内毒素脂多糖 (LPS) 以及非天然的聚乙烯吡咯烷酮等多聚体抗原也有同样的能力。因此，有人把这一类抗原称为不依赖胸腺的抗原 (Thymus independent antigen)。其他大多数抗原 (如球蛋白和其它单体抗原) 诱导体液抗体都需要 T 和 B 两类细胞的协作，因此，称为依赖胸腺的抗原 (Thymus dependent antigen)。比较这两类抗原的构造时，可以看出前一类抗原的构造特点是存在专一性相同的重复决定簇，而后一类则缺乏这种重复构造。由此可以合理地提出一个假定：一个抗原分子上重复排列的专一性相同的决定簇和反应细胞表面相邻受体结合，可能要比和相同数目，但不紧密相邻排列的决定簇(如在单体上的情况)结合，对发动 B 淋巴球的反应要有效得多。换句话说，不依赖胸腺的抗原由于存在重复决定簇，通过抗原的多价性，增加了和 B 淋巴球受体的亲合性，或交叉连接，因而能单独地发动 B 细胞的免疫反应。已知球蛋白表面只存在数目有限的和专一性各不相同的抗原决定簇。如果激活 B 淋巴球的分化需要和受体有较高的亲合力或交叉连接的话，它们只有预先通过载体决定簇和 T 细胞表面结合(或间接地和巨噬细胞表面结合)，形成多价的聚集物，才能达到同样的效果。

根据 T 和 B 淋巴球协同作用的假说，理论上对于引起产生体液抗体，在免疫原分子构造上的最低要求是应存在两类不同的抗原决定簇，以满足载体和半抗原的免疫学功能的需要。并且这些决定簇还必须在空间上按一定的方式排列，以保证细胞间的相互作用，才能满足这些需要。铁氧还蛋白(分子量=5,800) 正接近天然多肽能引起体液抗体所需的最低分子量。最近，有人报告氧化的铁氧还蛋白的 C 端 5 肽和 N 端 7 肽，可能分别起载体和半抗原决定簇的作用。这两个不同的决定簇只有和 BSA 连接，或者靠寡聚甘氨酸连接时，方呈现免疫原性。而且，寡聚甘氨酸桥的长短对诱导抗体产生的能力有决定性意义。桥长仅为 5 个甘氨酸残基时，没有免疫原性，而桥长达到 10 残基以上时，就有免疫原性。其次，如果将两个相同的决定簇 (C 端 5 肽)，即使通过 12 残基的桥相连，也没有免疫原性。这表明一个免疫原的免疫原性在结构上的要求至少存在两个专一性不同的抗原决定簇 (Levy 等, 1972)。天然多肽要满足上述分子构造上的要求，就必须达到一定的最低分子量。随着分子量的增加，抗原结构的复杂性也增加。当达到多聚体那样高的分子量时，又有可能出现重复排列的抗原决定簇。总之，分子的大小制约着抗原结构的复杂性，从而制约着抗原的免疫原性。因此，抗原分子的大小只有反映了分子结构的复杂

性、有效决定簇的数目、排列方式、与免疫活性细胞的亲合力以及被吞噬或阻留的能力时，才能对免疫原性有重要的意义。一般说来，对于不同的抗原系统，达到明显的免疫原性所需的最低分子量可能不同。这可能又和分子的外源性、构象等有关系。如果从细胞水平来考虑，淋巴器官内的网状内皮系统好象一个带有免疫学专一性的“分子筛”，能选择地阻留一定性质和一定分子量以上的抗原分子。因而，对于不同的抗原系统，阻留所需的最低分子量也可能不同。

抗原的分子构造的复杂性，尤其是有效决定簇的数目和排列方式，直接制约着它的免疫原性。这一概念也得到被半抗原不同程度地取代的丙烯酰胺直线聚合物的模式实验的支持。当每一聚合物分子上按适当间距排列的半抗原数目少于12—16时，没有免疫原性。当超过此数目时，就充分表现出免疫原性。因此，这一结果似乎说明，细胞对抗原的免疫反应似乎是量子化的，即至少要有最低数量的专一抗原受体（12—16）被多价抗原连结成一片空间上连续的免疫受体组（Immunon）时，才能触发反应细胞产生有效的信号而起免疫反应（Dintzis 等，1976）。

2. 抗原的物理状态。可溶性抗原和颗粒抗原

除去化学结构外，抗原的物理状态对免疫原性也有很大影响。一些免疫原性弱的可溶性抗原，由于分子的聚集而增加质点的大小，或吸附在颗粒表面时，都可能增加或使其获得免疫原性。很早以前就已经发现，红血球膜上的 Forssman 异嗜性抗原的类脂部分（半抗原），经血清蛋白质、高岭土或其它胶体颗粒吸附后，便能恢复原有的免疫原性。这一原理在增加许多弱抗原的免疫原性的实践中得到成功的应用。如甲状腺球蛋白和聚丙烯酰胺颗粒结合后，对家兔引起 IgM 的效价可提高 20 倍。一种毒蛇（Vipera palestinae）的蛇毒是很弱的抗原。过去无法得到能中合其中所含的神经毒素的抗血清。当这种蛇毒被 CM-纤维素吸附后，就变成对家兔很好的免疫原。由此得到能中和这种毒素的抗血清（Moroz 等，1963）。

这里还要提到一个关于抗原的物理状态影响免疫原性的重要实验。Dresser (1962) 把牛丙种球蛋白（BGG）盐水溶液经高速离心分为沉淀和上清液两部分。他发现沉淀（聚集状态）能使 CBA 品系小鼠诱导抗体形成，而上清液（非聚集状态）不但不能诱导免疫反应，而且当再次注射 BGG 聚集部分时也不能引起免疫反应，即出现了对 BGG 的耐受性。同样地，人丙种球蛋白（HGG）在家兔上的实验也得到相同的结果，而且还发现聚集的 HGG 能在兔脾脏内阻留，而非聚集 HGG 则不能（Biro 和 Garcia, 1965）。近来，还有人观察到聚集的 HGG 对豚鼠皮内注射后，便集中到引流淋巴结的生发中心、髓部和血窦的巨噬细胞，而可溶性 HGG 的分布则不同（Brown 等，1970）。这一效应也在临床上得到应用。对需要做组织移植手术的病人，事先注射可溶性（非聚集的）马丙种球蛋白使获得免疫耐受性。将来用含抗淋巴球抗体的马丙种球蛋白作为免疫抑制剂使用时，就不致出现严重的不利反应（Butler 等，1969）。

抗原分子的聚集或吸附在胶体颗粒表面能增加免疫原性的原因可能是抗原被局部集中，半抗原决定簇紧密地相邻排列，造成激活 B 淋巴球增生、分化的条件。最近，发现处于聚集状态的刀豆凝集素 A（Concanavalin A）以及和琼脂糖珠共价连接的植物血球凝集素（PHA）都刺激 B 淋巴球合成 DNA，虽然可溶性的刀豆凝集素 A 和 PHA 并

没有这种作用（Andersson 等，1972；greaves 和 Bauminger，1972）。这些事实都支持上述解释。此外，巨噬细胞对颗粒抗原吞噬能力的增加，也是一个可能的原因。

3. 免疫反应类型和分子结构的关系。体液免疫和细胞免疫与细胞协同作用

(1) 天然蛋白质抗原的载体效应

天然球蛋白分子表面仅具有数目有限的、专一性各不相同的决定簇。理论上，一个球蛋白分子的任何一个有效的决定簇都可以看作一个半抗原决定簇，而把分子的其余部分看作载体，分别和B淋巴球和T淋巴球的抗原受体起作用。如果是由多个不同亚基组成的分子，同样可以把一个亚基的决定簇看作是半抗原决定簇，而把其它亚基看作载体。Rajewsky 等（1967）证明家兔能产生对乳酸脱氢酶四聚体的一种亚基的抗体，而不产生对另一种亚基的抗体。然而，当用杂交的酶分子 LDH-III（亚基组成 AABB）免疫时却能同时产生对两种亚基的抗体。显然，一种亚基可能作为另一种亚基的载体。如果家兔对载体亚基产生了免疫耐受性，就不再能对杂交分子起免疫反应。所以，这一实验表明天然球蛋白同样可能存在载体效应，以及两种淋巴球协同作用的现象，以诱导产生半抗原抗体。

(2) 体液免疫和细胞免疫

目前普遍认为T细胞是同迟发型超敏反应（细胞免疫）和载体专一性有关的，而B细胞则负责半抗原专一性和形成体液抗体。T细胞和B细胞的抗原受体各自对决定簇的结构有不同的要求。对于大多数抗原，诱导体液抗体，需要两类细胞的协同作用。免疫反应中，两类细胞这种功能上的分工和协作对于免疫反应类型的调节有决定性意义。免疫原在分子结构上的特点（有无重复决定簇，是否同时存在半抗原决定簇和载体决定簇，以及它们在空间分布上的关系等）及其改变，都可能影响两类细胞间的相互作用，从而也影响免疫反应的类型。对鞭毛抗原系统的研究，在这方面提供了一些有价值的知识。

如前所述，鞭毛素抗原分子的大小和免疫反应及产生的抗体的类型有密切的关系，如多聚体能诱导 IgM 和 IgG 抗体的形成，而单体只能诱导 IgG 的形成。进一步的研究还发现在鞭毛素抗原系统中，抗原诱导循环抗体的能力和诱导细胞免疫的能力成反比。例如鞭毛素经 CNBr 裂解的片段“A”和鞭毛素本身相比，诱导抗体形成的能力减弱，而在成年大鼠诱导细胞免疫和免疫耐受性的能力则显著加强（Parish 和 Ada，1972）。此外，鞭毛素乙酸乙酰化程度逐渐增加时，诱导体液抗体的能力逐渐减弱，而诱导细胞免疫和免疫耐受性的能力却逐渐增强。同时其抗原性也相应地发生变化，和天然鞭毛素抗体反应的能力也降低。如果这种与抗体反应能力可以在某种程度上代表和B细胞抗原受体结合能力的话，于是便可以认为化学改性的鞭毛素诱导体液抗体能力的降低或许是由于和B细胞受体亲合力的降低。进一步推论，和B细胞有高亲合力的抗原倾向于诱导体液抗体，而低亲合力的抗原倾向于诱导细胞免疫和耐受性。也就是说，体液免疫和细胞免疫都针对相同的决定簇，不过细胞免疫（和耐受性）所要求的专一性较低（Parish，1971）。

对上述现象还可以作不同的解释。已知几种不同血清型的沙门氏菌的鞭毛素存在共同的抗原决定簇（Hc）和不同的抗原决定簇（Hv）。有证据表明 Hc 决定簇的专一性和 T

细胞及细胞免疫有关系，而 Hv 决定簇的专一性和体液抗体有关。因此，鞭毛素抗原在分子构造上同样可看作一个“半抗原-载体”系统，Hc 起载体决定簇的作用，而 Hv 起半抗原决定簇的作用。血清型 (f,g) 鞭毛素单体经化学改性(乙酸乙酰化)前后诱导细胞免疫反应(迟发型超敏反应)的能力和血清型 (1,2) 鞭毛素保持同样的强度，没有改变；而诱导体液抗体的能力显著降低。因此也可以假定化学改性主要选择地破坏 Hv 决定簇，结果诱导体液抗体的能力被破坏，而 Hc 决定簇仍然保持完整，从而能保持诱导细胞免疫的能力 (Langman, 1972)。同理，CNBr 裂解的“A”片段的免疫原性的变化，也可以假定是由于载体决定簇和半抗原决定簇被分离的结果。此外，一些蛋白质，如髓鞘碱性蛋白质的一个酶解片段 (15 肽)，能诱导对天然碱性蛋白的迟发型超敏反应，而不能和天然碱性蛋白的抗血清反应 (Lennon 等, 1970)。同样可以认为这一酶解片段中只含有载体决定簇。

总之，两类淋巴球在功能上存在分工，T 淋巴球和细胞免疫同载体专一性有关，而 B 淋巴球则负责产生循环抗体和半抗原专一性。与此相应地，免疫原在分子结构上也有分化，存在载体决定簇和半抗原决定簇。虽然影响免疫反应类型的因素是多方面的(抗原的性质和剂量、参与反应的细胞种类及其相互关系等)，并且从根本上说是依赖于两类淋巴球及其亚群的表面特性及其行为的 (Cunningham, 1974)，但是对于一定的有反应能力的动物，抗原(蛋白质或细胞抗原)结构的改变(特别是载体性质的改变)确实能影响两类淋巴球的相互作用，或专一地刺激一类细胞，从而改变免疫反应的性质。许多实验证明载体能直接影响抗半抗原抗体反应的性质。当半抗原和果聚糖、细菌脂多糖、肺炎球菌多糖 (SIII) 和 Ficoll 等具有重复结构的载体结合时，半抗原抗体反应的性质就成为不依赖胸腺的了 (Klaus 等, 1974, 1975; Inman, 1975)。红血球表面连接上一层大肠杆菌 0127 的脂多糖时，同样也转变为不依赖胸腺的抗原 (Möller 等, 1972)。载体的性质似乎还影响产生的免疫球蛋白的类别。如 DNP 半抗原和蛔虫抗原载体结合时，产生同种细胞亲合抗体 (IgE) 比和其它蛋白质载体结合时要高得多 (Strejen 和 Marsh, 1971)。半抗原和载体蛋白质连接的位置可能影响产生的抗体的性质。DNP 半抗原和 BSA 载体的羧基或氨基相连，免疫豚鼠时产生很高的抗 DNP 半抗原抗体和很低的抗 BSA 抗体。当 DNP 和 BSA 的酪氨酸残基相连，免疫时却会得到相反的结果。很可能在前一情形下，DNP 半抗原外露在载体分子表面，易于和免疫活性细胞的受体相互作用 (Hama 等, 1972)。每一个载体分子上连结的半抗原的数目似乎对此也有影响。单价的 NIP_1-BSA 倾向于诱导较高比例的 IgG 抗半抗原抗体，而多价的 NIP_{34}-BSA 倾向于诱导大量的 IgM 抗半抗原抗体 (Kontiainen, 1971)。对于细胞抗原，羊红血球同时受过碘酸氧化和乙酸乙酰化处理，便从主要诱导体液免疫的抗原转变成主要诱导细胞免疫的抗原 (Parish, 1972)。同样地，鸡红血球经戊二醛或甲醛固定后，保持诱导细胞免疫的能力，而失去诱导体液抗体的能力 (Dennert 和 Tucker, 1972)。这些发现或许可能用来加强肿瘤细胞表面抗原诱导细胞免疫的能力。近来，有人发现小鼠肿瘤细胞经戊二醛处理后仍保留原来的抗原专一性，但诱导细胞免疫的能力加强，体液免疫反应减弱了 (Sanderson 和 Frost, 1974)。

免疫机制中，两种淋巴球分工协作和免疫原结构上分化的假说，对自身抗体 (如 ACTH, 促胃液素等多肽激素的抗体) 产生的原因，也可能提供一个合理的解释。可以假

定正常动物体内可能存在相当数量的能和自身抗原的半抗原顺序起反应的 B 细胞群。然而，或者由于能对这种自身抗原的载体部分（内源载体）起反应的 T 细胞数量有限，或者产生了耐受性，B 细胞不能被激活，结果便不产生自身抗体。如果把具有和自身抗原相同顺序的多肽和“外源载体”连接，这些 B 细胞就可能在具有“外源载体”专一性的 T 细胞的辅助下而被激活，从而产生自身抗体（Chiller 等，1971；Benjamini 等，1972；1973）。反之，如果将一个半抗原和“自身载体”（同基因型的 IgG 最有效）共价结合，则能诱导对该半抗原的免疫耐受性（Borel 等 1971；Golan 和 Borel，1971；Borel 等，1973）。另一方面，蛋白质变性时构象的改变也可能造成免疫原性的改变。有些变性蛋白质不能诱导循环抗体，但可以诱导迟发型超敏反应。这种现象也可能和某些自身免疫性疾病的发病机制有关系。有人设想人体内某种天然蛋白质由于某些病理原因发生变性，结果成为对自身有免疫原性的抗原（Burnet，1960）。例如，因链球菌感染而继发的 γ-球蛋白变性被认为是引起类风湿性关节炎的一系列变化中的关键因素（Hollander 等，1965）。总之，抗原分子结构和免疫原性关系的研究对于了解某些自身抗体和自身免疫病的发病机理都可能是有帮助的。蛋白质酶解片段的免疫原性的研究在这方面也提供了一些有启发性的资料。

4. 蛋白质酶解片段的免疫原性和自身免疫

Kabat 等（1949）用同种或异种实验动物的脑组织注射到实验动物能引起类似临床的自身免疫性脑脊髓炎，称为实验过敏性脑脊髓炎（Experimental allergic encephalomyelitis，简称 E.A.E.）。后来，Eylar 和 Thompson（1969）从牛脊髓分离出 E.A.E. 抗原，证明是分子量为 18,400 的碱性蛋白质（简称 A.I. 蛋白质），是由 170 个氨基酸残基组成的一条单链线状分子，其全部排列顺序已测定清楚（Eylar 等，1971）。A.I. 蛋白质经胃蛋白酶分解后可得到 11 个片段，其中两个片段，“E”（16 肽）和“E. I.”（26 肽），比原来的 A. I. 蛋白质有更强的引起 E.A.E. 自身免疫病的免疫原性。由此可见，引起这种自身免疫病只需 A. I. 蛋白质分子上的小段多肽。

已知人的 A. I. 蛋白质（172 氨基酸残基）引起脑脊髓炎的主要抗原决定簇是包含色氨酸残基的一小段多肽：

$$\overset{114}{\text{-Ser-}}\boxed{\overset{115}{\text{Try}}}\overset{116}{\text{-Gly-}}\overset{117}{\text{Ala-}}\overset{118}{\text{Glu-}}\overset{119}{\text{Gly-}}\overset{120}{\text{Glu-}}\overset{121}{\text{Lys-}}$$

当用 2-羟-5-硝基溴苯（对色氨酸有专一作用）处理后，此决定簇失活，整个分子也随之失活，同样证明多肽链的一小段对于引起此种自身免疫病有密切关系（Eylar,1970）。

值得提到的是利用纯化抗原对猕猴的 E. A. E. 自身免疫病进行实验治疗得到的初步结果。猕猴的 A. I. 蛋白质的主要抗原决定簇位于顺序 134—170 肽段，并和人的 A. I. 蛋白质有交叉反应。当用人的 A. I. 蛋白质加 Freund完全佐剂足掌注射时，能在猕猴引起实验过敏性脑脊髓炎。当实验动物出现典型的临床症状（下肢瘫痪）后 24—48 小时，再用纯化的人 A. I. 蛋白质加 Freund 不完全佐剂肌肉注射，就能抑制病情的发展，并且大部分猴子能恢复健康（Eylar 等，1972）（表 1-6）。这一实验是在实验性自身免疫病已经出现确定的症状后，经实验治疗得到康复的第一个例子。此外，还观察到若事先注射低剂量的 A. I. 蛋白质（加 Freund 完全佐剂），可以在有限程度上预防注射全

表 1-6 猕猴实验过敏性脑脊髓炎出现临床症状后的抑制*

处理	动物总数	发病数	死亡数	康复数
A. I. 蛋白质	12	12	3	9
HNB-A.I. 蛋白质**	4	4	0	4
组蛋白	10	10	10	0
不处理	10	10	10	0

* 足掌注射人 A. I. 抗原 5 毫克(加 CFA)，12—13 天后发病。
** 人 A. I. 抗原之 2-羟-5-硝基苯溴衍生物。
(据 Eylar 等,1972)。

剂量抗原所引起的实验过敏性脑脊髓炎。如果在第一次低剂量注射后，再连续三次注射一种合成的碱性多肽（Ala，Glu，Lys，Tyr 的共聚物，分子量为 23,000)，就可能大大增加预防能力（Teitelbaum 等，1972)。由于用纯化抗原治疗自身免疫病具有高度的专一性，在自身免疫病的实验治疗研究方面是值得加以注意的。

5. "外源性"

动物蛋白质的免疫原性，通常与该动物和被免疫动物在系统分类上的亲疏程度成反比，血源关系相距愈远，即"外源性"愈大，则该动物的蛋白质抗原的免疫原性愈强。例如，鸭的蛋白质对鸡是较弱的免疫原，而对家兔是良好的免疫原。反之，分类上相近的物种之同一类蛋白质抗原(同源的抗原)在血清学上有交叉反应。如鸡卵白蛋白的兔抗血清能使各种家禽的卵白蛋白沉淀。同一物种的抗原与抗血清所起的反应最强；分类上相近的火鸡、珠鸡的卵白蛋白，则产生中等反应；分类上相距较远的鸭和鹅的卵白蛋白所产生的沉淀最少(表1-7)。一般说来，抗原的交叉反应强度和系统分类上的亲疏程度成正比。血缘关系愈近，交叉反应愈强；血缘关系愈远，交叉反应愈弱。血清学上的关系反映了系统分类上的关系。目前已证明，实际上外源性和交叉反应性是同一抗原分子在进化上的血缘关系在不同方面的反映，它们具有共同的分子基础。

表 1-7 卵白蛋白的来源对于鸡卵白蛋白抗血清所起沉淀反应强度的影响(录自 Carpenter, 1956)

家兔鸡卵白蛋白抗血清	卵白蛋白抗原的来源				
	鹑鸡形目			鹅形目	
	鸡	火鸡	珠鸡	鸭	鹅
	沉淀物的相对体积				
甲	100%	35%	26%	9%	9%
乙	100	67	57	42	31
丙	100	61	51	30	18

（三）蛋白质抗原的系统发生关系与交叉反应性及外源性

1. 物种的血清学分类

免疫化学的早期研究证明各种动物的同一类蛋白质之间可能存在血清学上的交叉反

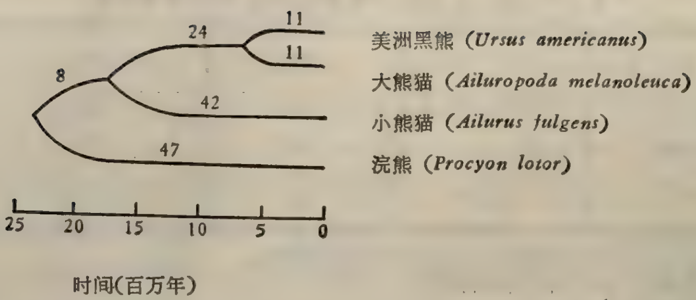


图 1-28　两种熊猫的系统发生。谱系线上的数字表示白蛋白和转铁蛋白的量的变化(按免疫学距离单位计量)。时间表是按 250 单位变化相当于 6 千万年计算(据 Sarich, 1973)。

应,交叉反应的程度反映这些物种在系统发生上的亲缘关系 (Landsteiner, 1945)。 这种血清学分类方法,曾经成功地应用到动物、植物以及微生物的分类上。三十年代Königsberg 学派根据血清学反应所显示的植物种、 属间的亲缘关系而绘出的系统树, 与根据解剖学、形态学、细胞学及古生物学材料得出的系统发生关系是非常一致的。同样在动物学方面,血液蛋白质的血清学比较研究,对于解决分类学和进化上的难题,至今仍然 是 重要的证据。大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是我国特产的珍贵动物,然而,它在系统分类上的地位,却是长期争论未决的问题。分类学家一般认为和它最接近的是熊 科 或浣熊科。可是,究竟更象熊,还是更象浣熊,就有意见分歧了。最近,有人用血清学方法肯定了大熊猫和熊最接近。因此,我们或许应当说大熊猫是熊 (Sarich, 1973)(图 1-28)。

血清学方法在古生物学和考古学上也有重要应用价值。最近发现许多化石内仍然保存着有机大分子,如蛋白质和多糖的残留物。这些大分子被密封在矿物化的组织内,和环境隔绝,虽然可能经过几千万年的漫长岁月,往往还完好地保留着抗原性。从七千万年前一种头足类箭石 (*Belemitella junior*) 的化石壳内提取出来的大分子物质,和现代头足类如乌贼 (*Sepia officinalis*)、鹦鹉螺 (*Nautilus pompilius*) 的提取物在免疫扩散上有交叉反应。用这种方法就可以直接捡定某些已绝灭的物种和现存物种之间的亲缘关系 (De Jong 等, 1974)。 除了上述理论研究上的兴趣外,血清学分类方法在经济鱼类、病源原生动物的种以下的分类上的应用,近年来也引起注意。这对于鱼群预测、寄生虫流行病学等方面,都可能有实用价值。关于血清学分类法在动物上的应用的较近的资料,可参考 Wright (1974) 的专著。

2. 免疫学交叉反应程度及外源性与蛋白质抗原分子的一级结构的种属差异的关系

动物的蛋白质抗原除有种属专一性外,还有器官和组织的专一性。不同物种的 同 一类组织专一抗原,如各种鸟类的晶体蛋白之间存在免疫学上的交叉反应。各种哺乳动物,如猪、兔和人的胰岛素之间也有交叉反应。这几种胰岛素分子的一级结构基本上相似,可以看作是进化上同源的分子,它们之间唯一已知的差别是 B 链 C 末端不同, 依次分别为 Ala、Ser 和 Thr。这提示同源的蛋白质分子间的交叉反应是基于其氨基酸排列顺序的相似性。

近来,对种系发生上同源的和突变的蛋白质,特别是对细胞色素 C、溶菌酶和血红 蛋白的交叉反应性、氨基酸排列顺序和构象的比较研究得出两条有普遍意义的原理:

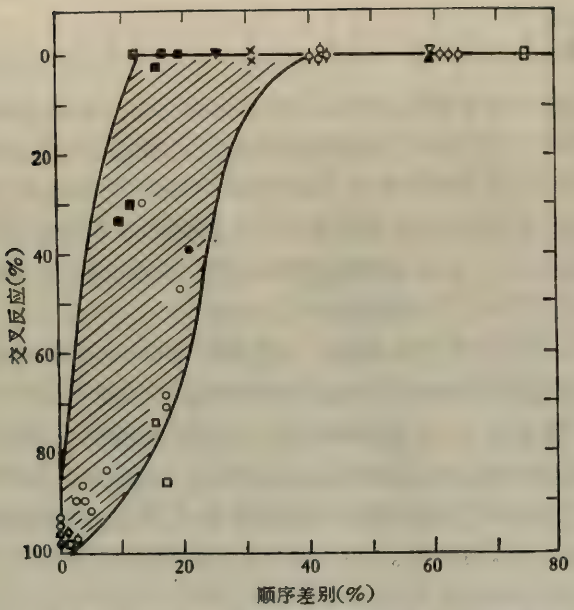


图 1-29　各种球蛋白免疫学交叉反应程度和氨基酸顺序差别程度的关系 (Prager 和 Wilson, 1971)。根据下列蛋白质研究结果绘制: (⊗)碱性磷酯酶;(△)碳酸酐酶;(♦)生长素-胎盘催乳素;(▼)铁氧还蛋白;(▲)盘尼西林酶;(▽)胰蛋白酶-胰凝乳蛋白酶;(●)胰核糖核酸酶;(◇)β-乳球蛋白;(×)枯草杆菌酶;(□)RNA 噬菌体外壳蛋白;(○)血红蛋白;(■)肌红蛋白;(ᵠ)溶菌酶。斜线区表示在这一顺序差别范围内通常呈现交叉反应。

(1) 同源球蛋白之间血清学上的交叉反应程度与其氨基酸排列顺序的相似程度大约成正比

对一系列已知一级结构的球蛋白的免疫学交叉反应程度和排列顺序差别程度之间的关系的研究结果总结于图 1-29 (Prager 和 Wilson, 1971)。由图可见,顺序差别小,交叉反应程度高;顺序差别增高,交叉反应程度减小。当顺序差别超过 30—40% 时,就不再有交叉反应了。如果只考虑位于球蛋白分子表面的顺序差别,这程相关性可能还要密切。如美洲鹌鹑和鸡的溶菌酶之间的交叉反应程度,测定的结果只相当于 1、2 个残基的差别,而比较两者的一级结构,却有 4 个残基不同 (Prager 等, 1972)。然而,如果从这些残基在分子表面的位置看来,其中 3 个残基位于分子表面陷入的地方,只有一个残基(残基 $68^{Lys\rightarrow Arg}$) 位于分子表面突出的地方,也就是有效的抗原决定簇的地方 (参看图 1-19; Arnon, 1968)。另一方面,对人、猕猴、马、骆驼、牛、羊、山羊和精鲸的肌红朊的结构、构象和交叉反应性的比较研究,表明球蛋白的抗原构造的相似性不一定和它们的排列顺序的相似性成正比。这种情况很可能是受到这些分子在进化过程中,因氨基酸的置换而产生的构象差异的影响(Atassi 等, 1970a, b)。因此,同源球蛋白之间的交叉反应性更可能是由分子局部构象的相似性决定的。只有当排列顺序的相似性能反映分子局部构象的相似性时,才能用以表示和交叉反应程度的关系。严格说来,用免疫化学交叉反应程度来测量球蛋白之间排列顺序的差别,只是一个简化的和近似的量度,因为这是以假定进化过程中出现的氨基酸置换不影响,或很少影响整个分子总的构象为前提的。其次,它所测定的实际上只是和分子表面局部构象的差异有关的顺序差异,而不是全部顺序差异。

(2) 个别氨基酸的置换可能引起整个球蛋白分子抗原性和免疫原性的改变

分子生物学上的一个重要现象是蛋白质的同种异型（Allotypes），即同一种蛋白质存在不同的分子形式。它们的化学性质很相似，但可用免疫化学方法把它们区分开来。人的血红朊、免疫球蛋白（如 IgG）都是几种同种异型分子的混合物。同种异型蛋白是由一对或一对以上的等位基因控制的，它们之间的差别是由于基因突变造成肽链上一小段氨基酸排列顺序（甚至仅仅一个氨基酸单位）的改变。例如血红朊 A1 和 S 只有一个氨基酸残基的差别（$\alpha_2\beta_2^{Glu\rightarrow Val}$）（Reichlin 等，1966）。

根据对突变蛋白质，主要是溶菌酶，细胞色素 C（Nisonoff 等，1972）和血红朊的广泛研究，发现位于球蛋白表面的个别氨基酸的置换和抗原性的变化有直接的关联。例如，人和猕猴的细胞色素 C 分子结构的唯一差别是残基 58 不同（残基 $58^{Ile\rightarrow Thr}$）。这一残基位于分子表面，可能参与抗原决定簇的形成。人的细胞色素 C 上 58 位置的 Ile 在猕猴上被 Thr 代替，结果当用家兔抗人细胞色素 C 的抗血清检测时，发现抗原性降低 25—40%（Nisonoff 等，1970）。另一方面，若用猕猴细胞色素 C 免疫家兔，得到的

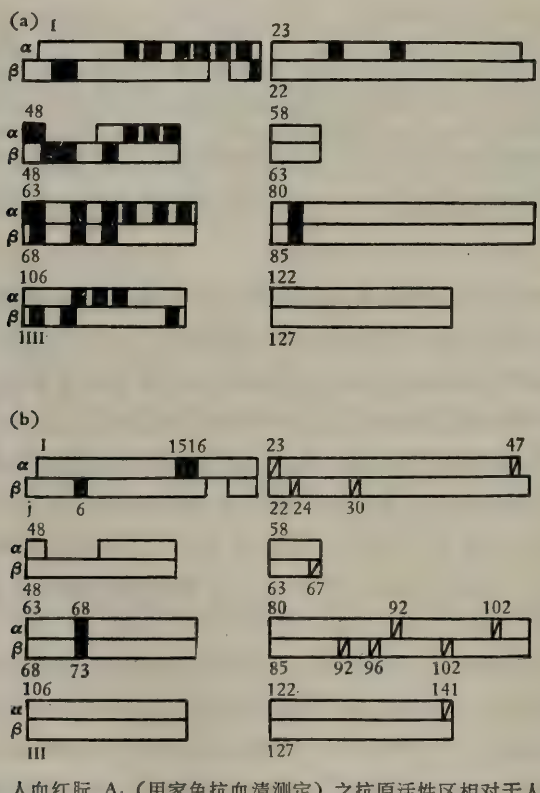


图 1-30 人血红朊 A_1（用家兔抗血清测定）之抗原活性区相对于人和家兔血红朊氨基酸顺序的差异之位置关系。（a）顺序差异的直线图，差异用黑方块表示。α 和 β 链顺序按最大同源程度排列。由图可见，主要的顺序差异(90%)出现在四个区域。（b）抗原活性区域的位置。用家兔抗 HbA_1 血清测定时可区别的人突变血红朊，用黑方块表示；不能区别的用斜线表示。比较以上两图可见，抗原活性区倾向于分布在多肽链含顺序差异的区域，而无差异的区域主要是无免疫活性的。（据 Reichlin，1972）。

抗猕猴细胞色素 C 的抗血清，却不能区分人和猕猴的细胞色素 C。也就是说，当残基 58 的 Ile 被 Thr 代替时，就使原来对家兔有免疫原性的决定簇变成免疫学上不活动的区域，不能在家兔引起针对该部位的抗体。已知家兔细胞色素 C 残基 58 和猕猴相同，同样是 Thr。因此，猕猴细胞色素 C 含残基 58 的部位对于家兔没有免疫原性是和这一事实一致的，也就是说球蛋白分子有免疫原性的抗原决定簇是分子表面构造和被免疫动物的同源蛋白质有差别的部位；如果这种差别不存在了，该部位也就失去免疫原性了。

人血红朊突变分子的系统研究发现，对于家兔抗人血红朊 A1 的抗血清测定系统，某些(不是全部)个别氨基酸置换和免疫原性的改变有关系，而另一些位置的置换则无关系。在人 HbA_1 (免疫原)和家兔 Hb (被免疫动物的同源蛋白质)的氨基酸排列顺序的差别，与残基置换能否引起免疫原性的变化之间，在分布上存在有趣的关联。如图 1-30 所示，抗原活性区域(用家兔抗人 HbA_1 抗血清检测时，能区别的人突变血红朊)分布在免疫原分子和被免疫动物的同源分子的多肽链存在排列顺序差别的区域(图左侧的四个段落)，而抗原性上不能区别的突变主要位于分子进化上保守的区域(图右侧的四个段落)(Reichlin, 1972)。因此，这种相关性有力地支持球蛋白的抗原决定簇是分子表面构造和被免疫动物的同源蛋白质分子之有差别的部位。在分子水平，抗原的交叉反应性和免疫原性(外源性)对分子结构的依赖是同一现象的两个侧面，它们都依赖于抗原分子进化过程中出现的排列顺序的差异，以及由此决定的分子表面局部构象的差异。免疫原和被免疫动物的同源分子之间，分子结构的相似性决定抗原之间的交叉反应性；而它们的分子结构的差别性(即“外源性”)又决定其免疫原性。抗原专一性和免疫原性不仅决定于蛋白质抗原的一级结构，更重要的还决定于分子表面的局部构象(抗原决定簇)。总之，从蛋白质抗原分子进化中，系统发生关系和交叉反应性的关联的研究结果，更加充实了前几节中得出的关于抗原专一性和免疫原性的分子基础的结论，并从抗原分子进化过程中产生的排列顺序的种属差异说明了抗原专一性和免疫原性产生的历史根源。

(四) 几类重要的天然蛋白质和多肽抗原

1. 细菌毒素

蛋白质的免疫原性在预防免疫上有重要的实际意义。破伤风杆菌、白喉杆菌、志贺氏痢疾杆菌和肉毒杆菌都能产生外毒素 (Exotoxin)，释放到环境中。毒素是一种含多糖-类脂的复合蛋白质，可形成结晶。毒素经甲醛或其它适当处理减毒以后，仍保持免疫原性，称为类毒素 (Toxoid)。类毒素能引起中和毒素的抗体，故可用于预防注射。显然，抗原决定簇和毒性基团是不同的，但在空间排布上可能是相邻的基团。因此，过去曾经假定当抗毒素和毒素结合时可能阻碍了毒性基团的作用。近年来对于白喉毒素的毒性、抗原性和分子构造关系的研究，使我们对毒素的中和机制有了更深入的了解。

白喉毒素对敏感细胞的毒性作用是抑制细胞的蛋白质合成。这种抑制作用是由于毒素具有 NAD-转移酶 II-ADP 核糖转移酶 (NAD-transferase II-ADP-ribose-transferase) 活力，能把 NAD^+ 之 ADP 核糖基团转移到氨基酰转移酶 II (Aminoacyl transferase II)，并与该酶发生共价结合从而抑制酶的活力：

$$NAD^+ + \text{氨基酰转移酶 II} \rightleftharpoons \text{ADP-核糖-转移酶 II} + \text{菸酰胺} + H^+$$

由于氨基酰转移酶 II 在蛋白合成中起关键作用，因此毒素对该酶的作用，就导致细胞蛋白质合成的抑制。

白喉毒素是分子量约为 62,000 的一条多肽链，完整分子不表现酶活性。从细菌释放出来后，在还原条件下可被酶解为两个具有不同功能的片段（图 1-31）（Gill 和 Dinius,1971）。片段 A（分子量 = 24,000）在离体条件下表现酶活性，能将 ADP-核糖从NAD^+转移到氨基酰转移酶 II 上。片段 B（分子量 = 38,000）含有三个半胱氨酸，负责和敏感的细胞专一地结合，并能使片段 A 进入细胞（Gill 和 Pappenheimer，1971）。因此，对活体细胞的毒性作用需要毒素分子的这两个片段协同作用，片段 B 负责细胞专一性（识别作用），片段 A 则起毒性作用（杀伤作用）。

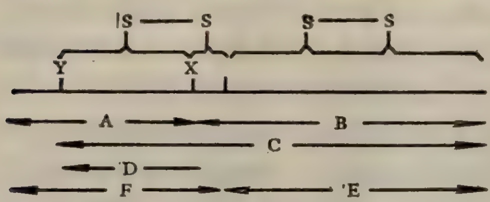


图 1-31　白喉毒素降解片段间的关系。
括号表示二硫桥连接区域； X表示胰蛋白酶敏感点；
Y表示非还原条件下胰蛋白酶水解点
（据 Gill 和 Pappenheimer，1971）。

通过对马和家兔抗白喉毒素的抗血清与纯化的片段 A，B，以及无毒性而和白喉毒素有血清学关系的 Crm_{45} 和 Crm_{197} 突变蛋白质之间的定量免疫化学研究，确定了一些抗原决定簇在毒素分子上的位置（Pappenheimer 等，1972；Pappenheimer 和Gill，1973）。抗片段 A 抗体能抑制分离的片段 A，以及激活的毒素分子在离体条件下的酶活力，但不能在活体内中和毒素。抗片段 B 抗体对毒素分子有高度的亲合力，能在整体内中和毒素，阻止它和敏感细胞的细胞膜结合。由于抗片段 A 抗体缺乏在整体内中和毒素的作用，因此抗白喉毒素的抗血清中，只有当抗片段 A 含量低而抗片段 B 高时，才可能有较大的中和毒素的亲合力。从表 1-8 可见，高亲合力的抗血清只含很少的或不含抗片段 A 抗体，而亲合力低的抗血清则含相当高比例的抗片段 A 抗体。一般说来，抗白喉毒素的亲合力和抗片段 A 的含量成反比。

总之，抗白喉毒素中和毒素的机制主要依赖抗体和片段 B 之间的相互作用（尤其是 C 末端分子量 17,000 的肽段）。在整体内抗毒素的作用主要在于阻止毒素分子和敏感细胞

表 1-8　抗白喉毒素血清中抗片段A含量和亲合力的关系

抗　血　清	亲合力（整体：离体比值）	毒素可沉淀抗体总量中抗片段A之含量(%)
No. 5353（马）	>1.2	<20
SA. No. 10（马）	1.2	30
S.A. No. 10（经 CrM45 吸附）	>1.2	0
TUrG（家兔）	1.0	30
TUrG（经 CrM_{45} 吸附）	1.2	0
抗 CrM_{45}	0.25	70
抗 CrM_{197} No. 1	≤0.1	>90
No. 2	≤0.1	>90
No. 3	0.5	50
抗 CrM_{197} No. 1	1.0	0
（甲醛处理）No. 2	1.0	15

（据 Pappenheimer 等，1972）。

细胞膜的结合，而不是抑制其毒性基团的作用(酶活力)。事实上，马抗毒素（SA10），当用 Crm45 吸附去除所有其它的沉淀抗体，只剩下抗 C 端分子量 1,7000 的肽段的抗体时，表现出中和毒素的最大亲合力，尽管它不能影响激活的毒素的酶活力。从这些理论研究结果不难看出毒素分子的结构和功能关系的研究，对于生产高亲合力的（高防护力的）抗毒素是有重要应用价值的。

2. 病毒抗原

病毒是含 RNA 或 DNA 的复合蛋白质。通常由许多亚基构成。烟草斑纹病毒（TMV）是植物病毒中研究得最透彻的一种抗原，可作为一个代表。

TMV 分子呈棒状，大小约为 180×3000 Å。分子量达到 40×10^6，病毒的外壳是由 2200 个相同的蛋白质亚基组成，每个亚基含 158 氨基酸单位。亚基分子量为 17,500。外壳核心有一条盘绕成螺旋形的 RNA 链(图 1-32)。

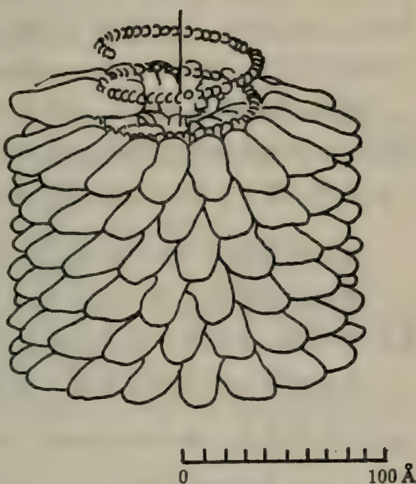


图 1-32 烟草斑纹病毒构造简图。内部的螺旋形链为 RNA，被蛋白质亚基所包围（据 Klug 和 Caspar, 1960）。

TMV 的抗原性和病毒分子的空间构象有密切关系。由于蛋白质亚基环绕 RNA 内核规则地排列，因而可能出现依赖四级结构的新的抗原决定簇。这一类决定簇可能是由几个相互作用的亚基共同构成的，也可能是由于亚基间相互作用造成的一个亚基的构象变化而新出现的(Rappaport 和 Zaitlin, 1970)。

利用亚基酶解片段抑制抗病毒血清和病毒之间的免疫反应的方法，分析 TMV 抗原结构的早期工作发现，亚基分子上存在几个抗原活性区域，相当于多肽链上的下述顺序：18—23，62—68，123—134，129—131，142—158 和 153—158 (C 末端)。这些决定簇可能分布在病毒的外表面上（Anderer, 1963）。

进一步对亚基蛋白的胰蛋白酶酶解片段的免疫化学研究发现，93—112 位置的多肽片段和抗亚基蛋白抗体(抗 TMVP) 的亲合力最高。这一片段包含 20 个氨基酸残基，其排列顺序如下：

$$\overset{93}{\text{Ile}}\text{-}\overset{94}{\text{Ile}}\text{-}\overset{95}{\text{Glu}}\text{-}\overset{96}{\text{Val}}\text{-}\overset{97}{\text{Glu}}\text{-}\overset{98}{\text{Asp}}\text{-}\overset{99}{\text{Gly}}\text{-}\overset{100}{\text{Ala}}\text{-}\overset{101}{\text{Asp}}\text{-}\overset{102}{\text{Pro}}\text{-}\overset{103}{\text{Thr}}\text{-}\overset{104}{\text{Thr}}\text{-}\overset{105}{\text{Ala}}\text{-}\overset{106}{\text{Glu}}\text{-}\overset{107}{\text{Thr}}\text{-}$$

$$\overset{108}{\text{Leu}}\text{-}\overset{109}{\text{Asp}}\text{-}\overset{110}{\text{Ala}}\text{-}\overset{111}{\text{Thr}}\text{-}\overset{112}{\text{Arg}}\text{-}$$

如果把此 20 肽的 N 端 12 个氨基酸残基（93—104）切除后，不影响和抗体的亲合力，而 C 端 2 肽($\text{-}\overset{111}{\text{Thr}}\text{-}\overset{112}{\text{Arg}}\text{-}$)切除后就失去部分亲合力，进一步切去 Ala(110)，就丧失全部免疫学活力（Benjamini 等，1965）。利用人工合成的肽段，证明 93—112 肽段的抗原决定簇位于其 C 端 10 肽的位置（Stewart 等，1966）。进一步利用人工合成的长度不同的肽段（C 端 2 肽到 10 肽)的实验，还证明能和抗 TMVP 抗体专一地结合的最短的肽段是 C 端 5 肽（-Leu-Asp-Ala-Thr-Arg-）（Young 等，1966）；并且还确定了 C 端

5 肽是 93—112 肽段内的唯一的抗原决定簇（Benjamini 等，1968）。

利用合成的结构类似物的比较研究，还可以提供抗原决定簇微细结构的知识。用这种方法证明上述 5 肽中的靠 C 端 3 肽（-Ala-Thr-Arg-）是负责抗原专一性的关键基团，而其中靠 N 端的 2 肽（-Leu-Asp-）只是起加强和抗体结合的作用。此靠 C 端 3 肽（-Ala-Thr-Arg-）虽然单独不能和抗体结合，但其上若连接一个疏水性基团，如 ^{14}C—N—辛酰-Ala-Thr-Arg-就能很强地和抗体结合。和抗 TMVP 抗体的结合能力与连接基团的疏水性存在一定的相关性。因此，此 5 肽的抗原专一性是其中靠 C 端 3 肽负责的，而和抗体的结合还需要靠 N 端疏水性基团和抗体结合位点间的相互作用的帮助才能实现。换句话说，一个抗原决定簇的微细结构在功能上可分为两部分：一部分是负责抗原专一性的，它和抗体结合位点之间存在严格的空间互补性；另一部分是非专一的，不存在严格的空间限制，只是通过与抗体结合位点间的疏水性相互作用而加强前一部分和抗体结合位点的专一的结合（Benjamini 等，1968b）。

最后，还要提到 TMV 亚基蛋白之 C 末端 6 肽（153—158）对抗原性的重要性，也在 TMV 某些突变株的抗原性的改变中反映出来：

正常 TMV：Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr

153 154 155 156 157 158

突变病毒株：Thr-Ser-[Ala]-Pro-Ala-Thr

突变病毒株和正常 TMV 肽链结构唯一的差别是 C 端 155 氨基酸残基位置 Gly 为 Ala 所取代，抗原专一性也发生改变。

动物病毒的构造极其复杂。这里只举几类抗原构造研究得多一些的病毒为例：

（1）腺病毒（Adenovirus）

直径约为 72 毫微米，分子量约达 175×10^6。有一个正 20 面体对称结构的蛋白质外壳包围着 DNA。病毒的 18% 蛋白质和 DNA 连结，称为 P 抗原。外壳由 252 个多角形壳微体（Capsomers）组成。其中 240 个称为六联体抗原（Hexon），排列成许多三角形面；余剩的 12 个壳微体，称为五联体抗原（Penton），位于 20 面体的每一个顶点，其上伸出 12 根像天线样的、末端带小球的细丝。

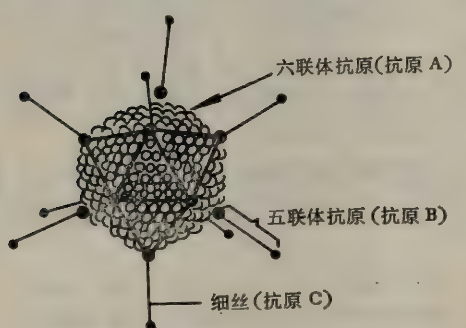


图 1-33 腺病毒构造简图，示各种抗原在病毒体上的分布（据 Allison 和 Burns, 1972）。

六联体抗原（抗原 A）能固定补体，是所有腺病毒共同具有的族抗原。五联体抗原（抗原 B）对寄主细胞有毒性。细丝（抗原 C）为类型专一的抗原（图 1-33）。

（2）流感病毒（Influenza Virus）

流感病毒的大小和形状均不固定（常为圆球或椭球形，直径介于 80—120 毫微米之间）。病毒的基本构造为螺旋形盘绕的 RNA 蛋白质，被复杂的蛋白质外壳包裹。壳的表面密集着糖蛋白分子，具血球凝集素作用，称为 V 抗原。它的功用可能是使病毒附着在

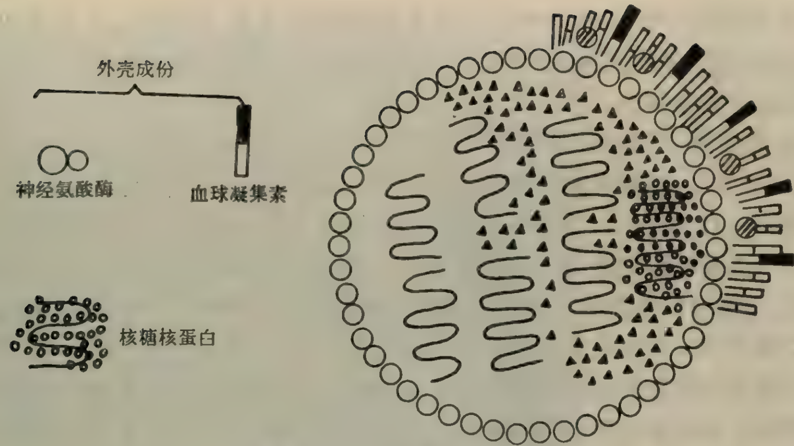


图 1-34　流感病毒构造简图。

易感细胞表面的受体上。它们的下面有神经氨酸酶（Neuamidase）分布，其功能可能和病毒从细胞释放出来有关系。寄主细胞抗原（血型抗原、Forssman 抗原等）在病毒形成过程中，也可能参入病毒的外壳（图 1-34）。宿主感染流感病毒后，能产生对抗这几种抗原的抗体。不过只有位于病毒表面的两种抗原所引起的抗体对机体才有保护意义。

流感病毒的血球凝集素亚基是棒状分子，大小约为 140×40 Å，分子量为 150,000，由两条重链（分子量≒60,000）和两条轻链（分子量≒20,000）构成。轻链和重链通过二硫键连接成二聚体，每一个血球凝集素亚基包含两个这样的二聚体。

血球凝集素位于病毒表面，决定病毒的类型特性。决定血球凝集素抗原性的基因能独立地发生变异，同时经常受到寄主体内免疫学环境的选择，从而产生流感病毒变异株。这种变异现象很可能和回复性流感大流行的发生有关系。已知流行性感冒（A 型）的大流行常间隔几年时间，反复地发生。在两次大流行之间，病毒的表面抗原逐渐变化。当一个新的病毒株之表面抗原和当前流行的病毒株有很大差异时，就又会引起一次大流行。

对于在 1968 年香港流感大流行发生之前收集的 A2/亚洲流感病毒株和在 1968—1971 年在世界各地收集的香港流感病毒株的表面抗原，进行比较研究的结果，发现从两种病毒分离出来的血球凝集素亚基在免疫学性质上截然不同，而神经氨酸酶亚基却是相似的。香港病毒血球凝集素亚基之重链和轻链的酶解肽段电泳层析图谱和 A2/亚洲流感病毒有很大的不同。这些结果提示香港流感病毒的血球凝集素亚基可能不是从预先存在的人 A2 病毒株通过突变起源的，更有可能是通过和鸟类或其它动物的流感病毒的遗传重组而起源的（Laver, 1972）。

用菠萝蛋白酶处理流感病毒，从消化液中可分离出结晶的血球凝集素。这样得到的血球凝集素的结构改变（失去分子量约 3000 的一段多肽），并失去血球凝集能力，不过其抗原性不受影响。这样的抗原可能对于制造流感病毒亚基疫苗是有价值的（Brand 和 Skehel, 1972）。另一方面，神经氨酸酶尽管研究还不多，由于它的抗原性较少变异，在研制可能对多种变异的病毒株都有保护作用的亚基疫苗时，是特别值得注意的。

(3) 肝炎抗原

人病毒性肝炎是由至少两种传染途径不同的病毒引起的。乙型肝炎抗原（HBAg），

原名澳大利亚抗原（Au antigen），或肝炎相关抗原（简称 HAA），与血清型肝炎（主要通过输血传染）的相关性是肯定无疑的。但是 HBAg 在病理发生中的作用，以及和传染原的关系还没有完全解决。

HBAg 是含醣、脂类和核酸的蛋白质大分子。其沉降常数为 40.2S—110S，分子量上限约为 2.4×10^6。抗原对热很稳定，不易被蛋白酶分解，这些特性都可能和高的醣含量有关系（Burrell, 1973）。HBAg 抗原在血清学上是一个复合物，包含四种抗原成分。电子显微镜下抗原的形态分为三类：大球形颗粒（或称 Dane 颗粒）（直径 42 毫微米），小球形颗粒（直径 20 毫微米）和管型（或称丝状构造）。含 HBAg 的血清在中性条件下，加入聚乙二醇 6000，可使大球形颗粒和管型抗原沉淀，而小球形颗粒大多数仍留在溶液中。由此可将不同形态的颗粒初步分离（Neurath 等，1973）。HBAg 阳性血清经连续两次等密度离心初步纯化后，再经过一次速度沉降离心纯化，便可将三种形态的抗原颗粒清楚地分离（图 1-35）。将这样分离的三部分作电子显微镜检查，可见 A 峰完全是小颗

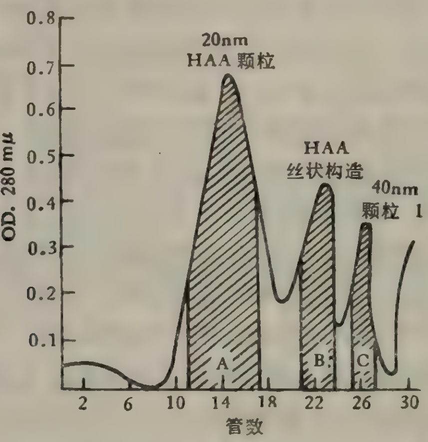
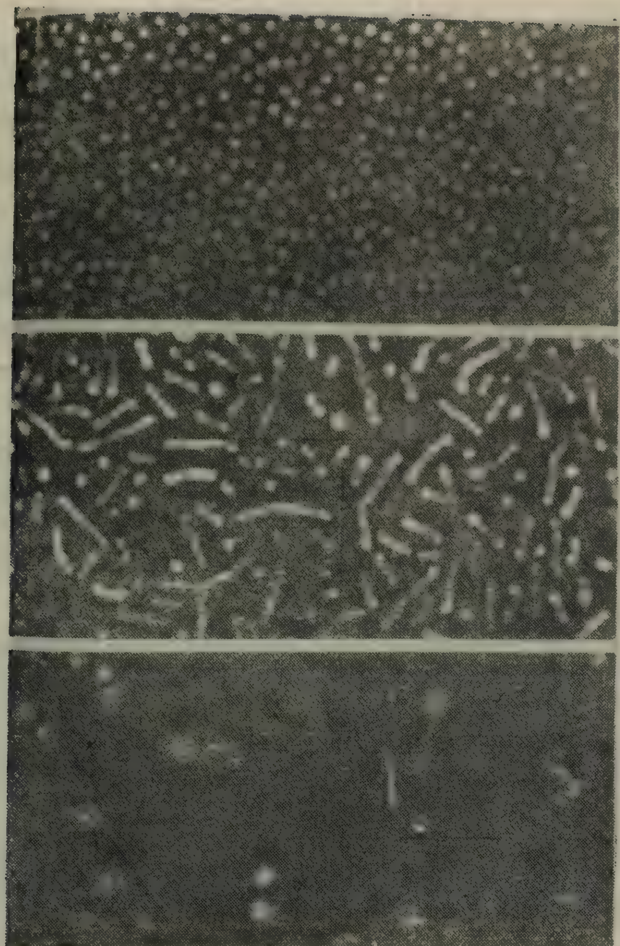


图 1-35　HAA 阳性血清连续两次等密度离心（B-29 型区域转头）得到的半纯制品的最后纯化。第三次用 $CsCl_2$ 梯度速度沉降法（B-14 型区域转头）将三种形态的抗原分为三个峰（据 Vyas 等，1972）。

粒（20 毫微米），B 峰主要是管型（丝状构造），C 峰以大颗粒（40 毫微米）居多（图 1-36）。各蛋白峰的化学特性列于表 1-8。由表 1-8 可见，A、B 峰含有 HBAg 抗原专一性，而不含人正常血清蛋白抗原。C 峰没有 HBAg 抗原专一性，而含人血清蛋白抗原。由于 A 峰完全由形态均一的小颗粒（20 毫微米）组成，有人假定可代表纯化的 HBAg 抗原，可作为进一步研究其抗原结构的材料（Vyas 等，1972）。

HBAg 表面还发现有三种糖蛋白、一种糖脂和三种磷脂成分存在。从其抗原专一性判断，它们很可能来源于寄主细胞的细胞膜，即在病毒成熟和释放过程中参入其外壳组成的。有证据表明这些寄主细胞膜抗原的存在可能引起自身免疫，而和肝细胞损伤的发病机制有密切关系。因此，制备肝炎疫苗时，如采用含有肝细胞膜成分的 HBAg 表面抗原将是很不利的，最好采用从 HBAg 分离的亚基，可能更安全妥当些（Zuckerman, 1975）。

HBAg 小颗粒抗原（20 毫微米）的蛋白部分不易酶解，用通常的生化方法不能得到有免疫学活性的亚基。最近有人在存在尿素和巯基乙醇的条件下，用超声波处理 HBAg。



(A) 峰　20 nmHAA

(B) 峰　HAA 丝状构造

(C) 峰　HAA 40nm

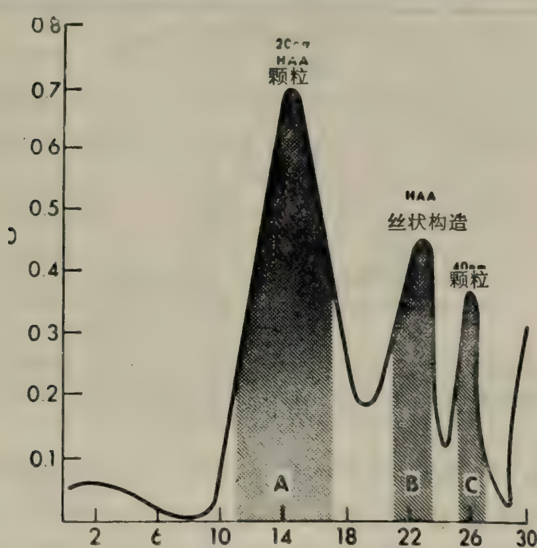


图 1-36　取自上图 A、B、C 峰蛋白样品的电子显微镜反染照片(×150,000)
(据 Vyas 等,1972)。

然后再经 Sephadex-G75 凝胶过滤，可分离出有免疫活性的三个亚基，分子量各为80,000，12,000和6,000（图1-37；表1-9）（Vyas 等，1972；Rao 和 Vyas，1973）。最近，同一实验室从 HBAg 表面抗原分离出一个分子量为22,000的多肽成分和一个分子量为28,000的糖多肽。它们具有相同的末端9肽（-Met-Glu-Asn-Ile-Thr-Ser(Cys)-Gly-Phe-Leu）（Peterson 等，1977）。此外，Zuckerman（1975）实验室用聚丙烯酰胺凝胶制备电泳，将 HBAg 表面抗原分离成5—9多肽成分，分子量介于15,000到120,000之间。总之，以上这些工作为 HBAg 抗原结构分析准备了条件。可以期望不久的将来就能把 HBAg 的抗原结构弄清楚，并为乙型肝炎亚基疫苗的研制奠定基础。

表1-9 半纯化 HBAg 经速度沉降分离的三个蛋白峰的特性

	A峰	B峰	C峰
电镜形态	球形(20毫微米)	不同长度的管形	球形(40毫微米)
OD_{280}	0.47	0.49	0.23
HBAg 血清学测定			
琼脂扩散	+	+	0
对流电泳	+	+	0
血凝抑制(效价)	64	32	0
抗人正常血清的抗血清	0	0	+

（据 Vyas 等，1972）。

表1-10 HBAg 亚基之免疫学活性的分布*

样品			免疫学活性
未	处	理	64
G75	I	峰	2
	II	峰	16
	III	峰	2

* 血凝抑制法（HAI）测定。效价用表现抑制的最大稀释度的倒数表示。

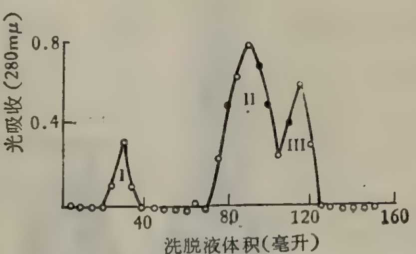


图1-37 超声处理 HBAg 在有尿素和巯基乙醇存在时之 Sephadex-G75 凝胶过滤分离。峰 I, II, III 的分子量估计各为80,000、12,000和6,000（据 Rao 和 Vyas，1973）。

至于 HBAg 和传染原的关系，还没有最后的结论。一般认为，健康带 HBAg 者血清中以小球形颗粒和管型为主，很少见到大球形颗粒（Dane 颗粒）。急性肝炎病人早期血清中的抗原颗粒类型与健康带 HBAg 者相似，不过小球形颗粒数量较多。慢性肝炎病人血清中管型较多，而 Dane 颗粒仅在少数病人（尤其是细胞免疫功能受到抑制的病人）

中有较大量存在。近来有人根据大球形颗粒（Dane 颗粒）的形态，有类似病毒的双层结构，以及和 DNA 聚合酶有关联，认为 Dane 颗粒很可能就是成熟的病毒本身，而小球形、管型颗粒则是非传染性的病毒外壳。同时，还有人认为 Dane 颗粒上的核心抗原和病毒感染有密切关系，并能产生核心抗体（Core antibody），可以作为乙型肝炎感染的标志（Zuckerman，1976）。总之，乙型肝炎抗原在血清学上是复杂的，亚显微形态也是多型的。这几种形态的抗原颗粒和传染原及发病机制的关系，还是没有完全弄清楚的问题。

甲型肝炎（传染型肝炎）抗原的研究目前更不清楚。Feinstein 等（1973）从急性期甲型肝炎病人粪便提取物中，用免疫电子显微镜术找到一种血清学专一性和甲型肝炎相关的病毒样抗原，其颗粒大小为 27 毫微米。这一观察后来还得到另一些工作者的证实（Zuckerman 等，1974）。

3. 激素

垂体前叶激素（LH、FSH，TSH，GH 等）、胎盘绒毛膜促性腺激素（HCG）和胰岛素等蛋白质激素都能引起抗体。多肽激素，如胰升血糖素（分子量＝3,485）、甲状腺降钙素（Calcitonin）（分子量＝3,604）、促胃液素（Gastrin）（分子量＝2,114）在有佐剂时，也有一定程度的免疫原性；而垂体后叶激素，如加压素、催产素等，由于分子量过小（≒1,000），没有免疫原性。蛋白质激素能引起抗体，称为抗激素。在临床和畜牧业上多次使用这些蛋白质激素时，有时会带来麻烦。如用猪或牛胰岛素治疗糖尿病时，有时会出现免疫反应。有人认为这可能是由于胰岛素和血清蛋白质结合，免疫原性增强的结果。

现将几种有代表性的多肽和蛋白质激素的分子结构和抗原性的关系分述如下：

(1) 缓激肽（Bradykinin）

组织损伤或过敏反应时，血清内出现的一种有很强的舒张血管和增加微血管通透性作用的多肽，称为缓激肽。它可能和免疫反应引起的局部炎症有关系，可视为一种局部激素。

缓激肽来源于血清中一种 α_2-球蛋白（缓激肽原）分子末端的酶解片段。它是包含 9 个氨基酸残基的短肽（图 1-38）。当它和多聚-L-赖氨酸连接时，能够在家兔引起专一的抗体。缓激肽的抗原性和肽链的全长度有密切的关系。C 末端增加或减少一个 Arg 残

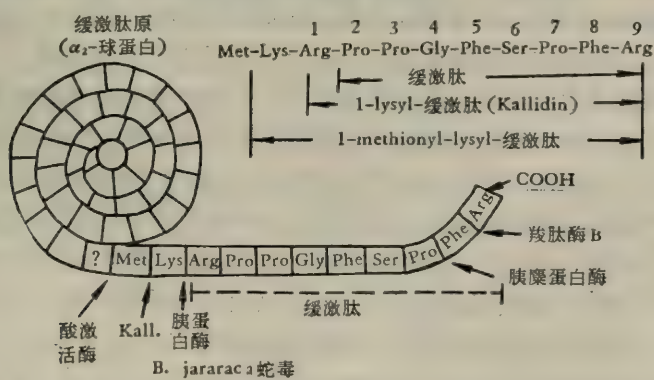


图 1-38　缓激肽及有关多肽和缓激肽原（α_2-球蛋白）分子末端的关系
（据 M. R. E. Silra 和 J. G. Leme, 1972）。

基，对此多肽和抗体的结合有相当大的影响。可是，当C末端的Arg残基被Ala或D-Arg置换时，影响却很小。由此推测，其抗原性和整条肽链的全长度有关系，而和末端残基侧链的性质关系不大。此外，分子的总电荷，C端或N端电荷的局部变化，以及Phe(8)或Ser(6)被Ala代替时，对分子的抗原性的影响都很小。可是，若改变多肽链的骨架，却会引起分子抗原性的剧烈变化。如Gly(4)被Ala代替后，由于β-碳原子的旋转受限制，分子构象便发生改变；2、3或7位的Pro个别地或全部被Ala或D-Pro代替时，对抗原性同样也有剧烈的影响。总之，可以设想缓激肽分子可能是以环形的形式和抗体结合位点起相互作用的，因而改变肽链长度或骨架，都会影响分子环形构象的稳定性。换言之，缓激肽分子的抗原决定簇可能包括多肽链的全长度，并依赖整个分子的形状(Haber 等，1967；Spragg 等，1968)。

(2) 促肾上腺皮质激素 (ACTH)

为脑垂体前叶分泌的包含39个氨基酸残基的多肽激素。分子为一条直链。人ACTH的一级结构如下(Lee 等，1961)：

```
                                  10                                      20
Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-

                     ┌-------------------------------------┐
                     ¦25             30                     ¦                    39
Lys-Val-Tyr-Pro-¦Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-Gln-Ser-Ala-Glu¦-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe
```

已知N端24个氨基酸残基在所有研究过的物种都是相同的，并且这一区域和分子的激素活性有关系；而25—33区域则存在物种间的差异。

ACTH分子或其片段和载体蛋白质结合时，能够引起抗体。激素的C端部分(25—39)具有抗原性，这一片段能强烈地抑制ACTH和其抗体的结合(Gelzer，1968)。用片段(1—24)和兔血清白蛋白载体结合的结合蛋白质来免疫家兔时，能得到抗片段(1—24)的抗血清。这种抗血清能够中和ACTH的激素活性，证明这一区域是激素的生物活性区(Felber 等，1966；Felber 和 Micheli，1967)。

(3) 促性腺激素

脑垂体前叶分泌的两种主要的促性腺激素，促滤泡激素(FSH)和黄体化激素(LH)都是分子量约30,000的糖蛋白。已经知道FSH和LH分子都是由α、β两个亚基组成的。其中一个亚基，α亚基，为FSH，LH，HCG和TSH所共有(或彼此相似)。这种分子构造上的共同性是这几种激素在免疫学上交叉反应的结构基础。

这几种促性腺激素之抗原结构的异同是建立它们的放射免疫测定的前提。对人促滤泡激素(hFSH)抗原结构的研究发现，这种激素分子至少含有四个能和抗体反应的区域：区域I(位于α亚基)和区域II(位于β亚基)在抗原性上彼此相似，并且又和HCG，hLH，hTSH之α亚基上相应的区域在抗原性上相似；区域III位于β亚基上；区域IV只存在于完整的hFSH分子上。区域I和/或II负责使hFSH分子能和HCGα亚基系统(HCG，LH，TSH)起交叉反应。区域III仅位于hFSHβ亚基上，抗hFSH标准抗血清的选择专一性就是针对这一特异的抗原决定簇的。此抗原决定簇区域单独不表现明显的激素活性。如在大鼠睾丸激素受体离体测定系统中，hFSHβ单独表现的生物活性很差。区域IV是依赖整个分子的抗原决定簇，在分离的hFSHα或hFSHβ亚基上

都几乎不存在。它可能是与激素活性有关系的区域（Rabinowitz 等，1973）。

蛋白质激素的生理功能基团和抗原决定簇可能处于分子的不同部位。如人绒毛膜促性腺激素分子的多糖部分对于激素的生理活性是必要的，但不参与抗原决定簇的构成。FSH 分子的多糖部分的神经氨酸对于激素的生理活性是不可缺少的，但与抗原性无关。其抗原决定簇含有半乳糖吡喃双糖单位。至于 LH 却是蛋白质部分，而不是多糖部分，对于激素的生理功能和免疫学功能都是必要的（Mori，1969a，b；1970）。

4. 酶

所有已知的酶都是蛋白质。注射酶可引起抗体，称为抗酶。大多数酶可被专一的抗血清部分地或全部地抑制。然而，也有一些酶虽能和专一的抗血清结合，但不被抑制，甚而被激活（如牛胰核糖核酸酶、盘尼西林酶等）（Cinader，1967）。实际上，在同一个抗酶血清内可能同时含有抑制抗体、激活抗体和非抑制抗体（能和酶结合，但无抑制作用）。如从牛胰核糖核酸酶抗血清中可分离出主要起抑制作用或激活作用的部分（Suzuki 等，1969；Pelichova 等，1970）。同样地，用免疫吸附剂也可以从抗木瓜酶的专一抗体中分离出抑制和激活两类抗体（Arnon 和 Shapiro，1967）。专一抗体不只是起抑制或激活作用，而且能增加酶对 pH、热或尿素变性的稳定性。因此，有时酶的激活或稳定的界限易于混淆不清。如一种突变品系小鼠的触酶对 pH、温度变化都很灵感。这种突变触酶和抗正常触酶抗体结合时观察到的“激活”现象，其实是这种酶被稳定化的结果（Feinstein 等，1971）。

专一抗体可能影响酶的催化中心，抑制或提高酶活力。抗体对酶的作用机制很复杂，一种可能是直接的，即专一抗体与酶催化中心或邻近的基团结合，结果阻碍了底物和酶的催化中心的接近；另一种可能性是更为间接的，即抗体和酶的结合可能引起酶催化中心构象转化，或者阻止了底物引起的酶分子构象改变所致。

抗体对酶活力的抑制程度和底物分子量的大小之间存在一定的关系。在同一个酶和抗酶系统中，抑制程度随底物分子量不同而不同（表 1-11）。从表上可见，在四种酶和抗酶系统中，底物分子量和抑制程度之间存在明确的相关性，底物分子量增加，抑制程度随之增加。早期的工作中，有人根据抗体对酶活性的影响依赖底物分子量的大小的事实，提

表 1-11　抗体对酶活力抑制程度和底物分子量的关系

酶		底物		抑制程度
名称	来源	名称	分子量	%
核糖核酸酶	牛胰	环胞嘧啶核苷酸	338	80
		核酸	大分子	98
神经氨酸酶	流感病毒	唾酸乳糖	633	0
		Orosomucoid fetuin	10^4	16
		唾酸糖蛋白	10^5	100
C′1- 酯酶	人	N-乙酰-L-酪氨酸乙酯	237	28
		C′4（补体第 4 成分）	大分子	100
胰蛋白酶		苯甲酰-精氨酸-P-硝基苯胺	398	23
		酪蛋白	大分子	87

（据 Cinader，1967）。

出抗体对酶的抑制可能是由于抗体和酶的结合造成了空间阻碍所致 (Cinader, 1967)。不过,较近的研究结果提示还有可能是通过空间构象改变所致。

后一种可能性的例子是乙酰胆碱酯酶。有证据提示专一抗体对乙酰胆碱酯酶活力的抑制可能是由于抗体和酶结合时,酶分子发生的构象变化,而不是由于空间阻碍。这些证据是:1) 酶和抑制抗体复合物的米氏常数(Km) 和游离酶的 Km 是相似的,表明并不存在底物和酶催化中心接近或反应产物离开的空间障碍;2) 专一抑制抗体存在时,只有乙酰硫代胆碱碘盐(ATch) 的水解被抑制,而分子量较大的底物丙酰硫代胆碱碘盐(PTch) 却不受抑制。假如抗体的抑制效应是由于空间障碍,分子量较大的底物(PTch) 至少也应受到部分抑制。事实上并非如此。因此,这种抑制效应显然不是由于空间障碍,而是由于其它原因,很可能是由于抗体和酶结合引起的构象变化所致(Holmes 等, 1973)。

然而,要证明这种可能性却是颇为困难的。因为抗体抗原相互作用时,双方都可能发生构象变化,很难用通常的理化方法测定各自的变化程度。为了解决这一难题,有人设计特殊的实验来验证激活抗体对酶催化中心结构完整性的恢复的影响。已知牛胰核糖核酸酶 A 的催化中心是由 N 末端多肽[尤其是 His(12)] 和 41 位, 115—121 顺序的氨基酸残基共同组成的(图 1-39)。当用枯草杆菌酶处理牛胰核糖核酸酶 A 时,酶分子被分解成两个片段,即 N 端的 S-多肽(包括残基 1—20 或 21) 和 S-蛋白质(包括残基 21 或 22—124)(图 1-40),催化中心因而被拆散,结果每一片段单独都不能表现出酶活力。然

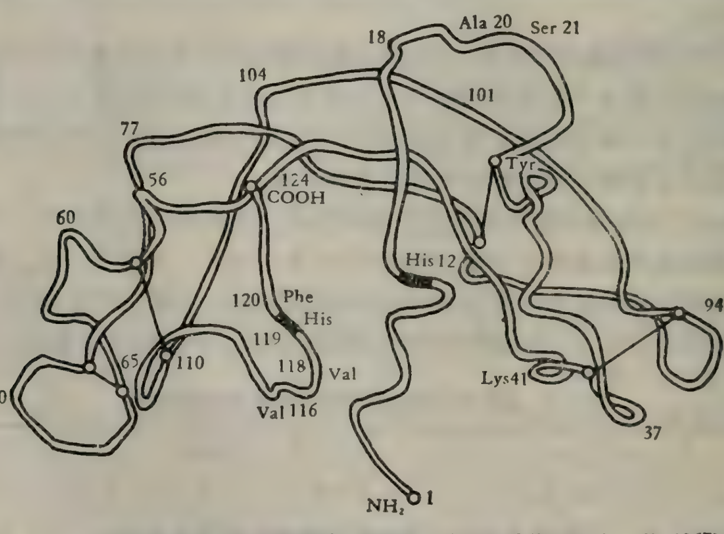


图 1-39 牛胰核糖核酸酶立体结构简图。黑线示二硫桥位置(据 Harker 等, 1967)。

而,当把两个片段混合时,酶活力又可恢复。假若激活抗体能改变酶的构象,那么有没有可能由此影响 S-蛋白和 S-多肽的结合,使酶催化中心的结构和功能得到恢复呢?实验的结果证明确系如此。当 S-蛋白和从抗 RNaseA 抗血清中分离得到的激活抗体结合时,酶活力最大恢复所需的 (S-多肽/S-蛋白) 克分子比值有所降低。这一事实可能反映两片段之间的结合常数的改变,而这种改变又可能是由于 S-蛋白和激活抗体结合时,恢复了 S-蛋白在天然酶分子中的构象所致。同样地,在和抗体结合后恢复的酶对底物的催化性能和天然 RNaseA 相似也可能是由于同样的构象变化的结果。总之,这些事实有力

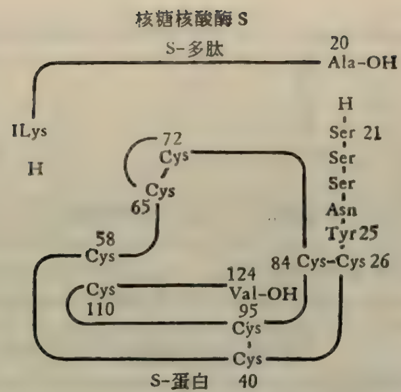


图 1-40 核糖核酸酶 S 与 S-多肽、S-蛋白系统(据 Gutte 和 Merri-field, 1970)。

地支持抗体和酶的结合,不仅是掩盖了酶分子的一部分表面,而且可能引起酶分子构象变化的假定(Cinader 等, 1971)。

简短的结论

1) 天然蛋白质是具有复杂结构的大分子,其专一的免疫学功能依赖大分子的各级结构。抗原专一性主要依赖分子表面的某些基团——决定簇的特殊化学结构。抗原决定簇按其对构象的依赖与否,又可分为构象决定簇和顺序决定簇两类。对于球蛋白,抗原决定簇位于分子表面的突出部位,并依赖该处的局部构象。纤维蛋白则存在中心决定簇(构象决定簇)和末端决定簇(顺序决定簇)。

2) 天然蛋白质的免疫学功能不但决定于暴露在大分子表面的决定簇的特性和数目,而且还决定于这些决定簇在分子表面的空间排布图式。因为通常蛋白质抗原是以天然的完整的大分子形式和免疫活性细胞表面的抗原受体起作用的。蛋白质变性,空间构象改变,免疫学功能(免疫原性和抗原专一性)也随之改变。

3) 一般说来,抗原的免疫原性在分子结构上的要求是:(1)“外源性”,即抗原分子表面具有免疫活性细胞从未接触过的决定簇;(2) 足够大小的分子量。

足够大小的分子量(>10,000)是大多数蛋白质有明显的免疫原性的重要条件。然而,在某些条件下,低分子量的多肽或蛋白质片段也有引起免疫反应的能力。对于不同的抗原系统,免疫原性所要求的最低分子量可能不同。抗原分子的大小和形状只有当它反映了分子结构的复杂性,有效决定簇的数目和排列时,对免疫原性才是重要的(图 1-41)。

此外,抗原的物理状态对免疫原性也有很大影响。低分子量的可溶性抗原被胶体颗粒吸附或处于聚集状态时,就加强或获得免疫原性。这可能和它们在淋巴器官内阻留和分布的变化,以及巨噬细胞的吞噬活动的加强有关系。

4) 免疫反应中两类细胞协同作用的假说及载体效应的发现对了解免疫原性的分子基础有重要意义。天然球蛋白分子表面仅具有有限数目的、专一性各不相同的决定簇,因而只有形成多价聚集物(通过 T 细胞的辅助作用)时,才能和 B 细胞表面的抗原受体有效

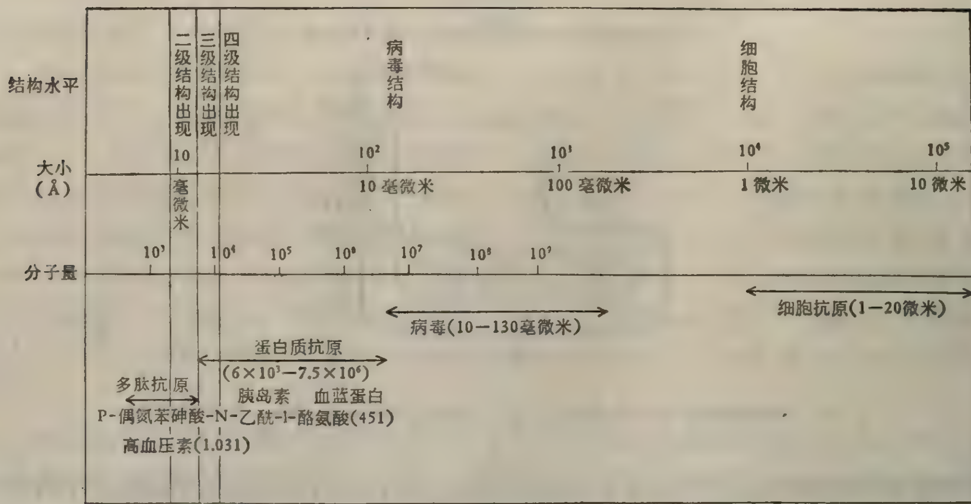


图 1-41 各类抗原的大小和结构的复杂性的关系。

地相互作用，诱导体液抗体的形成。具有重复抗原结构的抗原则能直接激活 B 细胞产生体液抗体。免疫原在分子结构上的特点（有无重复决定簇、是否同时存在半抗原决定簇和载体决定簇以及载体的性质等），可能影响两类细胞间的相互作用，从而影响免疫反应的类型（细胞免疫或体液免疫），以及抗体的类别。一般说来，蛋白质抗原诱导细胞免疫的能力和诱导体液免疫的能力成反比，并且变性蛋白倾向于诱导细胞免疫。这很可能是由于和 T 细胞表面抗原受体相互作用在结构上的要求比较不严格的缘故。

5）蛋白质抗原之间的交叉反应性和免疫原性依赖于抗原分子在进化过程中出现的氨基酸排列顺序的种属差异，以及由此决定的分子表面局部构象的差异。分子结构的相似性决定抗原之间的交叉反应性，而免疫原分子和被免疫的动物同源分子之间，分子结构的差别性（即“外源性”）又决定其免疫原性。这说明抗原性和免疫原性对抗原分子结构的依赖，有共同的历史根源。

参 考 资 料

人工抗原和蛋白质抗原

专著

Atassi, M. Z. (1977). Immunochemistry of Proteins, Academic Press.

Borek, F. ed. (1972). Immunogenicity. North-Holland Publ. Co., Amsterdam. London.

Boyd, W. C. (1962). Introduction to immunochemical specificity, Intersciences.

Burnet, F. M. (1969) Self and not-self, Cellular Immunology, Book I. Melbourne and Cambridge University Press.

Day, E. D. (1972). Advanced Immunochemistry. Williams and Wilkins Co.

Kabat, E. A. (1968). Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry Holt, Rinehart and Winston, Inc.

Landsteiner, K. (1945). The Specificity of Serological Reactions. 2nd ed., Harvard University Press.

Nossal, G. J. V. and G. L. Ada (1971) Antigens Lymphoid Cells, and the Immuno Response. Academic Press

Sela, M. (1973). The Antigens, Vol. I, Academic Press.

Sela, M. (1974). The Antigens, Vol. II, Academic Press.

Wright, C. A. (1974). Biochemical and Immunological Taxonomy of Animals, Academic Press.

综述

Allison, A. C. and Burns, W. H. (1972). Immunogenicity of animal virus. In: "The Immunogenicity." p. 155.

Atassi, M. Z. (1975). Antigenic structure of myoglobin: The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins, *Immunochemistry* 12, 423.

Ben-Efram. S. (1971). Antigenic specificity. In: "New Concepts in Allergy and Clinical Immunology", Proc. 7th Inter. Congr. Allergology, Florence, p. 57.

Benjamini, E., D. Michaeli and J. D. Young (1972). Antigenic determinants of proteins of defined sequences, Current Topics Microbiol. Immunol. **58**, 85.

Benjamini, E., R. J. Scibienski and K. Thompson (1972). The relationship between antigenic structure and immune, specificity, In: "Contemporary Topics in Immunochemistry", Vol. I, Plenum Press. N. Y., p. 1.

Benacerraf, B., et al. (1970). Hapten-carrier relationships, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **169**, 93.

Cinader, B. (1967). Antibodies to enzymes-A discussion of the mechanisms of inhibition and activation In: "Antibodies to Biologically Active Molecules", p. 85.

Crumpton, M. J. (1967). The molecular basis of the serological specificity of proteins, with particular reference to sperm-whale myoglobin. In: "Antibodies to Biologically Active Molecules", p. 61.

Crumpton, M. J. (1974). Protein antigens: The molecular basis of antigenicity and immunogenicity. In: "The Antigens", Vol. II, p. 1—72, Academic Press.

Parish, C. R. and Ada, G. L. (1972). Bacterial flagellin as an antigen and immunogen. In: "Contemporary Topics in Immunochemistry" Vol. I, p. 77-, Plenum Press.

Reichlin, M. (1976). Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. *Adv. in Imm.* **20**, 71.

Sela, M. (1969). Antigenicity: Some molecular aspects, *Science* **166**, 1365.

Sela, M. (1970). Structure and specificity of synthetic polypeptide antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **169**, 23.

Sela, M. (1972). Structural features of antigens, In: "Immunoglobulins: Cell Bound Receptors and Humoral Antibodies," Vol. 26, p. 87, North-Holland.

Sela, M. (1973), Antigen design and immune response. In: "Harvey Lectures 1971—1972", p. 213.

Smaster, M. (1971). The pathogenesis of reactions to drugs. In: "New Concepts in Allergy and Clinical Immunology," Proc. 7th Inter. Congr. Allergology, Florence, p. 191.

Zukerman, A. J. (1972). Introduction to the current status of hepatitis antigens. In: "Progr. in Immunol. Standardization." Vol. 5.

论文

Anderer, F. A (1963). Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus *B. B. A.* 71, 246.

Andersson, J., Edelman, G. M., Möller, G. and Sjöberg, O. (1972). Activation of B lymphocytes by locally concentrated concanavalin A. *Europ. J. Immunol* 2, 233

Arnon, R and Shapiro, E. (1967). Antibodies to papain. A selective fractionation according to inhibitory capacity. *Biochemistry* **6**, 3942.

Arnon, R. (1968). A selective fractionation of anti-lysozyme antibodies of different determinant specificities. *Eur. J. Biochem.* 5, 583.

Arnon, R. and Sela, M. (1969). Antibodies to a unique region in lysozyme provoked by a synthetic antigen conjugate, *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **62**, 163.

Arnon, R., Maron, E. Sela, M. and Anfinsen, C. B. (1971). Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigea. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **68**, 1450.

Atassi, M Z. (1967) Immunochemistry of sperm-whale myoglobins prepared with various modified porphyrins and metalloporphrins. *Biochem. J.* **103**, 29.

Atassi, M. Z. (1970). Immunochemistry of sperm-whale myoglobin. VI. Preparation and conformational analysis of eight mammalian myoglobins. *B. B. A* **221**, 612.

Atassi, M. Z. and Salpin, B J. (1968). Immunochemistry of sperm-whale myoglobin. I. The specific interaction of some tryptic peptides and peptides containing all reactive regions of antigen. *Bio-*

chemistry **7**, 688.

Atassi. M. Z., Tarlowski. D. P. and Paul, J. H. (1970). Immunochemistry of spermwhale myoglobin. VII.Correlation of immunochemical cross reaction of eight myoglobins with structural similarity and its dependence on conformation. *B. B. A.* **221**, 623.

Atassi. M. Z., Habeeb, A. F. S. A. and Ando. K. (1973). Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. VII. Location of all the antigenic reactive regions. A new approach to study immunochemistry of tight protein. *B. B. A.* **303**, 203.

Benjamini. E., Young. J. D., Peterson, W. J., Leung. C. Y. and Shimizu, M. (1965). Immunochemical studies on the tobacco mosaic virus protein. II. The specific binding of a tryptic peptide of the protein with antibodies to the whole protein. *Biochemistry* **4**, 2081.

Benjamini, E., Shimizu M., Young, J. D. and Leung, C. Y. (1968). VI. Characterization of antibody populations following immunization with tobacco mosaic virus protein, *Biochemistry* **7**, 1253.

Benjamini, E., Michaeli, D. Leung, C. Y., Wong, K. and Scheuenstuhl, H. (1973). Immunochemical studies with synthetic peptides related to collagen. *Immunochemistry* **10**. 629.

Bergstrand. H. (1973). Localization of antigenic determinants on bovine encephalitogenic protein. Further studies with the macrophage migration inhibition assay in guinea-pigs. *Immunochemistry* **10**, 611.

Bill. W., Timpl, R. and Furthmayr, H. (1973). Conformation dependence of antigenic determinants on the collagen molecule. *Immunol.* **24**, 13.

Biro, C. and Garcia, G. (1965). The antigenicity of aggregated and aggregate-free human gamma-globulin for rabbits. *Immunol.* **8**, 411.

Blacke. C. C. F., Koenig, D. F., Mair. G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. and Sarma, V. R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional fourier synthesis at 2Å resolution. *Nature* **206**, 757.

Bonavida, B., Miller, A. and Sercarz, E. E. (1969). Structural basis for immune recognition of lysozyme. I. Effect of cyanogen bromide on hen egg-white-lysozyme. *Biochemistry* **8**, 968.

Borel, Y. (1971). Induction of immunological tolerance by a hapten (DNP) bound to a non-immunogenic protein carrier. *Nature New Biology* **230**, 180.

Borel, Y., Lewis, R. M. and Stollar, B. D. (1973). Prevention of murine lupus nephritis by carrier dependent induction of immunologic tolerance to denatured DNA. *Science* **182**, 76

Borek, F., Kurtz, J. and Sela. M. (1969). Immunological properties of a collagen like synthetic peptide *B. B. A.* 188. 314.

Brand. C. M. and Skehel. J. J. (1972). Crystalline antigen from the influenza virus envelope. *Nature New Biol.* **238**, 145.

Brown, R. K. (1962). Studies on the antigenic structure of ribonuclease. III. Inhibition by peptides of antibody to performic acid oxidized RNase. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1162.

Burrell, C. J., et al., (1973). Carbohydrates in hepatitis B antigen. *Nature New Biol.* **243**, 260.

Butler, W. T., et al., (1969). Prevention of rapid immune elimination of antilymphocytic globulin in transplant patients. *Nature* **224**, 856.

Cebra, J. J. (1961). Studies on the combining sites, of the protein antigen silk fibroin. I Characterization of the fibroin-rabbit antifibroin system. *J. Immunol.* **86**, 190.

Cebra, J. J. (1961). III Inhibition of the silk fibroin-antifibroin system by peptides derived from the antigen. *J. Immunol.* **6**, 205.

Chiller, J. M., Habicht. C. S. and Weigle. W. O. (1961). Kinectic differences in unresponsiveness of thymus and bone marrow cells. *Science* **171**, 813.

Cinader, B., Suzuki. T. and Pelichova, H. (1971) Enzyme activation by antibody. III. The effect of antibody on activity-restoration in mixtures of S-peptide and S-protein. *J. Immunol.* **106**. 1381.

Clark, C. and Munroz. J. (1970). Delayed hypersensitivity to insulin and its component polypeptide chains *J. Immunol.* **105**, 574.

Crumpton, M. J. (1964). The immunological activity of chemotryptic peptides of sperm-whale myoglobin. *Biochem J.* **91**. 4c.

Crumpton, M. J. (1966). Conformational changes in sperm-whale metmyoglobin due to combination with antibodies to apomyoglobin. *Biochem. J.* **100** 223.

Crumpton, M. J. (1967). An antigenic site of sperm-whale myoglobin. *Nature* **245**, **17**.

Crumpton, M. J. (1968). Antigen-antibody interaction. *Biochem. J.* **103**, 2p

Crumpton, M. J. and Wilkinson, J. M. (1965). The immunological activity of some of the chemotryptic peptides of sperm-whale myoglobin. *Biochem. J.* **94**, 545.

Crumpton. M. J., Law. H. D. and Strong. R. C. (1970). The C-terminal antigenic site of sperm-whale myoglobin: The immunological activities of synthetic peptides related to the C-terminal of myoglobin. *Biochem. J.* **116**, 923.

Cunningham, A. J. (1974). Predicting whate antibodies an antigen will induce: The inadequacy of the determinant model. *Current Topics in Microbiol. Immunol.* **67**, 97.

Dennert, G. and Tucker. D. F. (1972). Selective priming of T cells by chemically altered cell antigens. *J. Exp. Med.* **136**, 656.

Dintzis, H. M., R. Z. Dintzis and B. Vogelstein (1976). Molecular determinants of immunogenicity: The immunon model of immune response. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**, 3671.

Dresser, D. W. (1962). Specific inhibition of antibody production. II. Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein antigen. *Immunol.* **5**, 378.

Eylar, E. H. (1971). Basic AI protein of the myelin membrane. The complete amino acid sequence. *J Bio. Chem.* **246**, 5770.

Eylar. E. H., et al. (1972). Suppression of the immune response: reversal of the disease state with antigen in allergic encephalomyeliteis. *Nature*, **236**,75.

Edmundson. A. B. (1965). Amino-acid sequence of sperm-whale myoglobin. *Nature* **205**, 883.

Inman, J. K. (1975). Thymus-independent antigens: The preparation of covalent, hapten-ficoll conju gates. *J. Immunol.* **114**, 704.

Feinstein R. N., Jaroslow, B. N., Howard. J. B. and Faulhaber, J. T (1971). Stabilization of mutant catalase by complex formation with antibody to normal catalase *J. Immunol.* **106**, 1316.

Feinstein, S. M., et al., (1973). Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* **182**, 1026

Felber, J. P., Ashcroft S. H. J, Villanueva A. and Vannotti, A. (1966). Antibodies to synthetic corticotrophin. *Nature* **211**, 654.

Gelzer, J. (1968) Immunochemical study of β-corticotrophin (1-24)-tetracosa peptide. *Immunochemistry* **5**, 23.

Gill, D M and Dinius, L. L. (1971) Observations on the structure of Diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **246**. 1485

Gill, D. M. and Pappenheimer. A. M. (1971). Structure-activity relationships in Diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **246**, 1492.

Goetze, E. J. and Peters, J. H. (1972). Immunologic alterations in bovine serum albumin resulting from partial or complete reduction and alkylation. *J. Immunol.* **108** 785.

Golan, D. T. and Borel, Y. (1971). Nonantigenicity and immunologic tolerance: The role of carrier in the induction of tolerance to the hapten. *J. Exp. Med.* **134**, 1046.

Greaves, M. F. and Bauminger, S. (1972). Activation of T and B cells by insoluble phytomitogens. *Nature New Biol.* **235**, 67.

Habeeb, A. F. S. A., Atassi, M. Z. and Lee, C. L. (1974). Peptides with strong immunochemical inhibitory activity from bovine serum albumin. Application of a novel approach. *B. B. A.* **342**, 389.

Hama, N., et al. (1972) Altered immunogenicity produced by change in mode of linkage of hapten to carrier. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**, 89.

Holmes. M. J., Michaeli, D. and Fudenberg, H. H. (1973). Immunoenzymology of acetylcholinesterase. IV. Studies on an enzyme-inhibitory antibody. *Immunochemistry* **10**, 639.

Jacobson. C., Fundling. L., Moller. N. P. H. and Steensgaard, J. (1972). Properties and immunochemical reactivities of native and modified human-serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **30**, 392.

Jauregui-Adell, J., Jolles, J. and Jolles, P. (1965).The disulphide bridges of hen's egg-white lysozyme. *B B. A.* **107**, 97.

De Jong. E. W. Westbroek, P. and Westbroek, J.F. (1974). Preservation of antigenic properties of macromolecules over 70 Myr. *Nature* **252**, 63.

Karniely, Y., Mozes, E., Shearer. G. M. and Sela M. (1973). The role of thymocytes and bone marrow cells in defining the response to the dinitrophenyl hapten attached to positively and negatively charged synthetic polypeptide carriers. Cell fractionation over charged columns. *J. Exp. Med.* **137**. 183.

Kelly, B. and Levy J. G. (1971). Immunological studies on the major haptenic peptide from performic acid oxidized ferredoxin from *Clostridium pasterianum. Biochemistry* **10**, 1763.

Kendrew, J. C., Watson, H. C., Strandberg, B. E., Dickerson, R. E., Phillips, D. C. and Shore. V. C (1961). The amino-acid sequence of sperm-whale myoglobin. A partial determination by X-ray methods, and its correlation with chemical data. *Nature* **190** 666.

Klaus. G. G. B. and Humphrey, J. H. (1974). The immunological properties of hapten coupled to thymus-independent carrier molecules. I. The characteristics of the immune response to dinitrophenyl-lysine substituted pneumococcal polysaccharide (SIII) and levan. *Eur. J. Immunol.* **4**, 370.

Klaus, G. G. B., Janossy, G. and Humphrey, J. H. (1975). III. The role of the immunogenicity of the carrier in the induction of primary IgM anti-hapten responses. *Eur. J. Immunol.* **5**, 105.

Koketsu, J. and Atassi, M. Z. (1974). Immunochemistry of sperm-whale myoglobin. XVI. Accurate delineation of the single region in sequence 1—55 by immunochemical studies of synthetic peptides. Some conclusions concerning antigenic structures of proteins. *Immunochemistry* **11**, 1.

Langman, R. E. (1972). The occurence of antigenic determinants common to flagella of different Salmonella strains. *Eur. J. Immunol.* **2**, 582.

Laver, W. G. (1972). The origin of pandemic strains of influenza. Evidence from studies of the structure of the hemagglutinin subunits In: "Immunity of Viral and Rickettiseal Diseases." p. 29.

Lennon, V. A. Wilks, A. V. and Carnegie, P. R. (1970). Immunologic properties of the main encephalitogenic peptide from the basic protein of human myelin. *J. Immunol.* **105** 1223.

Levy, J. G., Hull, D., Kelly, B. Kilburn D. G. and Teather, R. M. (1972). The cellular immune response to sythetic peptides containing sequences known to be haptenic in performic acid-oxidized ferredoxin from Clostridium pasteurianum. *Cell. Immunol.* **5**, 87.

Liu, S. and Brown, R. K. (1972). Studies of the carboxy terminal antigenic region of oxidized ribonuclease. *Immunochemistry* **9**, 1103.

Maron, E., Shiozawa, C. Arnon, R. and Sela M. (1971). Chemical and immunological characterization of a unique antigenic region in lysozyme. *Biochemistry* **10**, 763.

Maron, E., Webb, C., Teitebaum, D. and Arnon, R. (1972). Cell-mediated vs humoral response in the cross-reaction between hen egg-white lysozyme and bovine-lactalbumin. *Eur. J. Immunol.* **2**, 294.

Margoliash. E., Nisenoff, A. and Reichlin, M. (1970). Immunological activity of cytochrome C. II. Precipitating antibodies to monomeric vertebrate cytochrome C. *J. Biol. Chem.* **245**, 931.

Mihaesco, C. and Seligmann, M. (1968). Papain digestion fragments of human IgM globulins. *J. Exp. Med.* **127**, 431.

Michaeli, D., Senyk, G., Maoz, A. and Fuchs, S. (1972). Ascaris cuticle collagen and mammalian collagens: Cell mediated and humoral immunity relationships. *J. Immunol.* **107**, 103.

Möller, G., Andersson, J. and Sjöberg, O. (1972). Lipopolysaccharides can convert heterologous red cells into thymus-independent antigens. *Cell Immunol.* **4**, 416.

Mori, K. F. (1969a). Antigenic structure of human gonadotropins: Contribution of carbohydrate moiety to the antigenic structure of pituitary FSH. *Endocrinol.* **85**, 330.

Mori, K. F. (1969b). Antigenic structure of human gonadotropins: Importance of protein moiety to the antigenic structure of HCG *Endocrinol.* **86**, 97.

Mori, K. F. (1970). Antigenic structure of human gonadotropins: Pituitary leuteinizing hormone. *J. Endocrinol* **46**, 517.

Moroz, C., Goldblum, N. and De Vries, A. (1963). Preparation of Vipera palestinae antineurotoxin using carboxymethyl-cellulose bound neurotoxin as antigen. *Nature* **200**, 697.

Neurath, A. R., et al. (1973). Hepatitis B antigens: Separation of two populations differing in particle size distribution. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **143**, 440.

Nisonoff A., Reichlin M. and Margoliash E. (1970). Immunological activity of cytochrome C. II. Localization of a major antigenic determinant of human cytochrome *C. J. Biol. Chem.* **245**, 940.

Nossal, G. J. V., Ada, G. L. and Austin, C. M. (1964). Antigens in immunity. VI. Cellular localization of ^{135}I- and ^{131}I- labelled flagella in lymph nodes. *Aus. J. Exp. Biol. Med.* **42**, 311.

Omenn, G. S., Ontjes, D A. and Anfinsen, C. B. (1970). Immunochemistry of Staphylococcal nuclease. II. Inhibition and binding studies with sequence fragments. *Biochemistry* **9** 313.

Parish, C R. (1972). Preferential induction of cell mediated immunity by chemically modified sheep erythrocytes. *Eur. J. Immunol.* **2**, 143.

Parish, C. R. and Ada, G. L. (1969). The tolerance inducing properties in rats of bacterial flagellin cleaved at the methionine residues. *Immunol.* **17**, 153.

Phillips D. C. (1967). Lysozyme and the development of protein crystal chemistry. In: "Proceedings VII Int. Congr. Biochem." Tokyo. 1967. V. 36, p. 63.

Pappenheimer, A. M., Uchida, Jr. T. and Harper, A. A. (1972). An immunological study of the diphtheria toxin molecule. 1, 891.

Pappenheimer, A M. and Gill, D. M. (1973). Diphtheria. *Science* **182**, 353

Pelichova, H., Suzuki, T. and Cinader, B. (1970). Enzyme-activation by antibody. II. The distribution

of activating antibody in chromatographic fractions of ribonuclease antisera and their competition with inhibiting antibody for enzyme sites. *J. Immunol.* **104**, 195.

Perutz, M. F., Kendrew. J. C. and Watson. H. C. (1965). Structure and function of Haemoglobin. II Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **13**, 669.

Peterson, D. L., I. M. Roberts and G. N. Vyas (1977) Partial amino acid sequence of two major component polypeptides of hepatitis B surface antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 1530.

Prager. E. M. and Wilson, A. C. (1971a). The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. I. Micro-complement fixation studies. *J. Biol. Chem.* **246**, 5978.

Prager, E. M. and Wilson, A. C. (1971b). II. Comparison of precipitation and microcomplement fixation results. *J. Biol. Chem.* **246**, 7010.

Prager, E. M., Arnheim, N., Mross, G. A. and Wilson, A. C. (1972). Amino acid sequence studies on bobwhite quail egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.* **247**, 2905.

Rabinowitz D., et al. (1973). Multiple antigenic and biological determinants of human FSH and its subunits. *Nature New Biol.* **245**, 245.

Raff, M. (1970). Role of thymus-derived lymphocytes in the secondary humoral immune response in mice. *Nature* **226**, 1275.

Rajewsky, K., Rottlander, E., Peltre, G. and Müller (1967). The immune response to a hybride protein molecule. Specificity of secondary stimulations and of tolerance induction. *J. Exp. Med.* **126**, 581.

Rajewsky. K., Schirrmacher, V., Nase, S. and Jerne, W. K. (1969). The requirment of more than one antigenic determinant for immunogenicity. *J. Exp. Med.* **129**, 1131.

Rao, K. R. and Vyas, G. N. (1973). Hepatitis B antigen activity in protein subunits produced by sonication. *Nature New Biol.* **241**, 240.

Rappaport, I. and Zaitlin. M. (1970). Conformational changes in the antigenic determinant of tobacco mosaic virus protein resulting from polymerization of the subunits. *Virology* **41**, 208.

Reichlin, M. (1972). Local'zing antigenic determinants in human haemoglobin with mutants: Molecular correlations of immunological tolerance. *J. Mol. Biol.* **64**, 485.

Reichlin, M., Bucci, E. Antoni, E., Wyman, J. and Rossi-Fanelli, A. (1964). The immunochemical difference between horse oxy- and deoxyhaemoglobin. *J. Mol. Biol.* **9**, 785.

Reichlin, M. Bucci, E. Fronticelli, C., Wyman, J., Antoni, E., Iopplo, C. and Rossi-Fanelli, A. (1966). The properties and interactions of the isolated α- and β-chains of human haemoglobin. IV. Immunological studies involving antibodies against the isolated chains. *J. Mol. Biol.* **17**, 18.

Rittenberg, M. B. and Bullock, W. W. (1972). In vitro initiated secondary antihapten response. III. Separable roles of hapten and carrier in immune paralysis. *Immunochemistry* **9** 491.

Sach, D. H., Schechter, A. N., Eastlake, A. and Anfinsin. C. B. (1972). An immunologic approach to the conformational equilibria of polypeptides. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 3790.

Sanderson, C. J. and Frost, P. (1974). The induction of tumour immunity in mice using glutaraldehyde-treated tumour cells for immunization. *Nature* **248**, 690.

Sarich, V. M. (1973). The giant panda is a bear. *Nature* **245**, 218

Schechter. B., Schechter, I., Ramachandran. J., Conway-Jacobs, A. and Sela. M. (1971). The synthesis and circular dichroism of a series of peptides posessing the structure (L-tyrosyl-1-alanyl-1-glutamyl) n. *Eur. J. Biochem.* **20**, 301.

Schechter, B., Schechter, I., Ramachandran, J., Conway-Jacobs, A., Sela, M., Benjamini, E. and Shimizu, M. (1971). Synthetic antigens with sequential and conformation-dependent determinants containing the same L-tyrosyl-1-alanyl-1-glutamyl sequence. *Eur, J. Biochem.* **20**, 309.

Schwartz. M. R. J. Hooghe, E. Mozes and M. Sela (1976). Role of antigenic structure in cell to cell cooperation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 4184.

Senyk, G., Nitecki, D. and Goodman, J. W. (1971a). Immunogenicity of glucagon: determinants responsible for antibody binding and lymphocyte stimulation. *Science* **171**, 407.

Senyk. G., Williams, E., Nitecke, D. and Goodman, J. W. (1971b). The functional dissection of an antigen molecule: Specificity of humoral and cellular response to glucagon. *J. Exp. Med.* **133**, 1294.

Shika. S. (1967). Chemical studies of antigenic determinants of hen egg-white lysozyme. *I. Biken J.* **10**. 89.

Spilter, L., Benjamini. E., Young, J. D., Kaplan, H. and Fudenberg. H. H. (1970). Studies on the immune response to a characterized antigenic determinant of the tobacco mosaic virus protein.

J. Exp. Med. **131**, 133.

Spragg, J., Talamo, R. C., Suzuki. K., Appelbaum O. M. and Austen. K. F. (1968). Structural requirements for binding of bradykinin to antibody. II. Studies with bradykinin fragments. *Biochemistry* **7**, 4086.

Stewart, J. M., Young, J. D., Benjamini, E., Shimizu, M. and Leung, C. Y. (1966). Immunochemical studies on TMV protein. IV. The automated solid phase synthesis of a decapeptide of tobacco mosaic virus protein and its reaction with antibodies to the whole protein. *Biochemistry* **5** 3396.

Strejan, G. H. and Marsh, D. G. (1971). Hapten-carrier relationships in the production of rat homocytotropic antibodies. *J. Immunol.* **107**, 306.

Suzuki, T., Pelichova, H. and Cinader, B. (1969). Enzyme activation by antibody. I. Fractionation of immune sera in search for an enzyme activating antibody. *J. Immunol.* **103**, 1366.

Teitebaum, D., et al. (1972). Protection against experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* **240**. 565.

Teitebaum, D., Webb, C., Meshorer, A., Arnon, R. and Sela, M. (1973). Suppression by several synthetic polypeptides of experimental allergic encephalomyelitis induced in guinea pigs and rabbits with bovine and human basic encephalitogen. *Eur. J. Immunol.* **3**, 273.

Traub, W. and Piez, K. A. (1971). The chemistry and structure of collagen. *Adv. Protein Chem.* **25**, 243.

Vyas, G. N., Williams, E. W., Klaus, G. G. B. and Bond, H. E. (1972). Hepatitis-associated Australia antigen, Protein, peptides and amino acid composition of purified antigen with its use in determining sensitivity of the hemagglutination test. *J. Immunol.* **108**, 1114.

Young, J. D., Benjamini, E., Stewart, J. M. and Leung, C. Y. (1966). Immunochemical studies on tobacco mosaic virus protein. V. The solid phase synthesis of an antigenically active decapeptide of tobacco mosaic virus protein and the reaction of these peptides with antibodies to the whole protein. *Biochemistry* **6**. 1455.

Zuckerman, A. J., Bird, R. G. and Darnell, R. (1974). Hepatitis A virus-like particles *Brit. Med. J.* 1(5905), march **9**, 1974, p. 453.

Zukerman, A. J. (1975). Hepatitis vaccine: a note of caution. *Nature* **255**, 104.

Zuckerman A. J. (1976). Infectivity marker for hepatitis. *Nature* **263**, 374.

第二章　多糖和含多糖的抗原及类脂物

多糖和含多糖的物质是微生物、动植物细胞及其产物的另一种重要的抗原成分。细菌的荚膜、内毒素和血型物质以及葡聚糖和果聚糖等都是重要的多糖或含多糖的抗原。多糖抗原的免疫原性和所免疫的动物种类有密切关系。纯化的多糖抗原能对人和小鼠引起很好的抗体，但不能在家兔和豚鼠引起抗体。因此，多糖抗原的免疫化学研究多采用人抗体。

类脂物的分子量小，无固定构型，只起半抗原作用。某些类脂半抗原具有临床检验意义，也简略地论及。

一、多糖和含多糖的抗原

（一）多糖抗原的一般性质

1. 多糖抗原决定簇的大小

天然的葡聚糖是某些细菌利用蔗糖合成的只含葡萄糖的高聚物，分子量可高达一千万。葡聚糖分子虽很大，但构造却很简单。如 NRRL B512-葡聚糖的96％葡萄糖残基是通过α（1→6）配糖键连接的，其余4％葡萄糖残基是通过α（1→3）配糖键连接的，

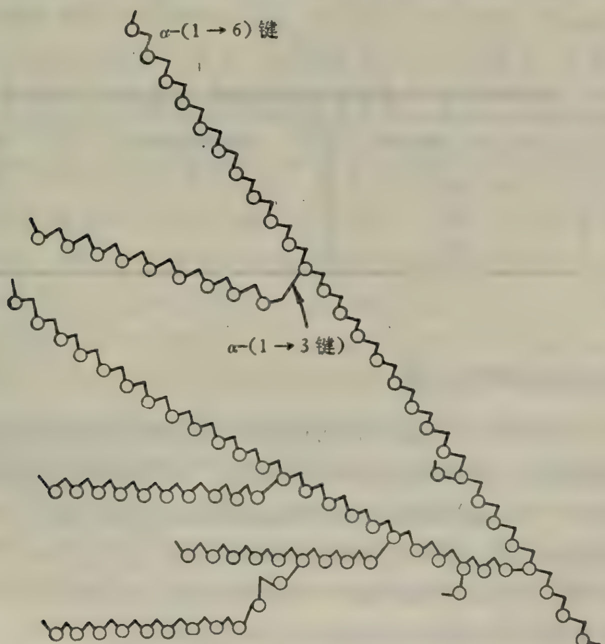


图 2-1　NRRL B512-葡聚糖分子一部分的构造。

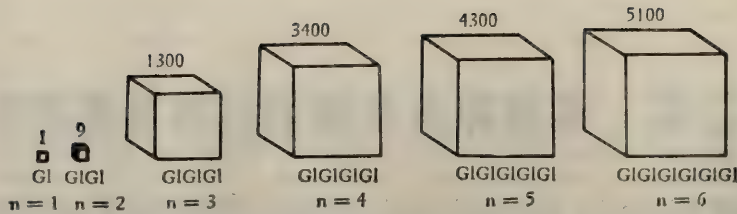


图 2-2 低聚葡糖对葡聚糖和抗葡聚糖抗体反应的相对抑制能力(据 Boyd, 1962)。

结果形成一个有许多分枝的构造(图 2-1)。由于这种构造的单一性，为研究抗原决定簇的性质提供了许多方便。

多糖抗原分子要达到足够大小，才能引起免疫反应。如葡聚糖的分子量小于 100,000 时，无免疫原性；大于 600,000 才能引起抗体的形成。Kabat (1957) 曾系统地研究了低葡聚糖 [$(Glu)_{n=1,2,3,\cdots\cdots}$] 对葡聚糖与同型抗血清的沉淀反应的相对抑制能力。随葡萄糖单位的数目 (n) 的增加，对抗体结合位点的相对抑制能力也增加，$n=6$时达到最大值，此后就不再增加了(图 2-2)。因此，6 聚葡糖为能进入葡聚糖抗体结合位点的最大基团，它可与抗体结合位点完全结合。已知 6 聚葡糖分子在最大伸展状态时，分子大小约为 34×12×7Å，这可能大致反映了决定簇的大小。不过，对应的抗体结合位点不一定就具有相当于容纳这种伸展分子的形态，因为 6 聚葡糖可能卷曲为更密集的构象 (Kabat, 1976)。根据这一系列实验，还可以计算出从 6 聚葡糖末端起每一个葡萄糖单位和抗体的结合自由能在整个抗原抗体结合自由能中所占的比例，列于表 2-1。由表 2-1 可见，最末一个葡萄糖单位占全部结合能的 39%。前 5 个单位共占 98%，第 6 个单位只占 2%。这一事实对于下述细菌多糖抗原末端几个单位对抗原专一性的重要性给予了合理的解释。

表 2-1 葡聚糖决定簇中各葡萄糖单位在全部结合自由能中所占的比例

葡萄糖单位数目	结合能 %	葡萄糖单位数目	结合能 %
5	98	2	60
4	95	1	39
3	90		

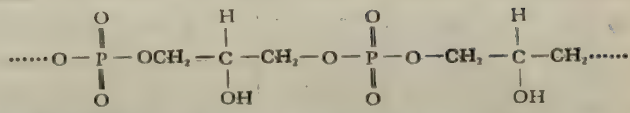
(据 Boyd, 1962)。

2. 多糖抗原的空间构象和抗原专一性

如前一章所述，大量事实证明蛋白质的抗原专一性和分子的空间构象有极其密切的关系。但是，对于多糖抗原，这方面的知识还很缺乏。对葡聚糖抗葡聚糖系统的早期研究，认为由于分子沿 α(1→6) 配糖键能作相当程度的自由转动，因此一个 6 聚葡糖在溶液中可能存在各种各样的构象，并产生相对应的各种抗体。后来，有人用含氨基糖的低聚糖作旋光散射光谱研究，发现这种低聚糖在溶液中可能保持比较固定的构象。免疫化学研究也有证据表明多糖的空间构象可能与抗原专一性有关系。

链球菌含有一类特殊的多糖，称为甘油-磷壁质 (Glycerine-Teichoic acid)。其

结构是甘油和磷酸相间连接而成的高聚物：



其中甘油残基第二碳原子上的羟基可能被丙氨酸酯化。

McCarty (1964) 在兔抗链球菌抗血清中，发现专一性不同的三类抗体。第一类抗体只能与被丙氨酸酯化的磷壁质起沉淀反应，其免疫学专一性可能是和含丙氨酸的决定簇互补的；第二类抗体和不含丙氨酸的磷壁质有很强的沉淀反应，而和含丙氨酸者只有轻度反应，这表明抗体的专一性是针对包含游离羟基的决定簇的；第三类抗体对含有和不含有丙氨酸的两种高聚物都能同样地反应。这提示这种抗体的结合专一性是针对甘油残基第二碳原子的—$\overset{\text{H}}{\text{C}}$—基团，而与亲水性基团无关。所有这些例子说明，这三种不同的抗体的结合位点各自针对抗原分子的一个特定部位。也就是说，多糖的抗原专一性可能依赖分子的空间构象。此外，血型物质抗原决定簇的专一性同样可能和空间构象有关系。这将在下文再谈到。

（二）沙门氏菌的抗原

沙门氏菌属 (*Salmonella*) 的抗原结构及其生物合成的遗传控制在分子水平有相当深入的研究，可作为细菌多糖抗原的代表。

这方面的研究是从沙门氏菌的血清学分类工作起始的。Kaufmann 和 White 根据这一类细菌含有两类主要抗原，即“O”抗原(胞体抗原)和“H”抗原(鞭毛抗原)，鉴别各种细菌品系的血清学类型，迄今已记录了近 1,000 个血清型 (Serotype)（或种)。血清学分类原理是用不同品系的沙门氏菌，按照标准手续免疫家兔，制备抗血清，并系统地测定这些抗血清和大量的不同品系之间的血清学反应。根据“O”抗原专一性的不同，能区分出四十多个血清学族 (Sero-group)。同一族的各物种(血清型)具有共同的“O”抗原决定簇(“O”因子)，彼此之间有交叉反应。如 D 族的所有物种都具有决定簇 9，B 族都具有决定簇 4。除去这种族专一的决定簇(“O”因子)以外，同一族的各种还具有一些各不相同的其它决定簇，因而在血清学上又可以彼此区别开来(表 2-2)。如属于 D 族的伤寒菌 (*S. typhi*) 具有 (9,12) 决定簇；*S. sendai* 具有 (1,9,12) 决定簇；而属于 B 族的副伤寒菌 (*S. paratyphi* B) 具有 (1,4,5,12) 决定簇；*S. abortus equi* 具有 (4,12) 决定簇，如此等等。由于每一个种都可能存在许多决定簇，也就可能呈现大量的交叉反应。因此，在进行血清学分类时，需要使用吸附方法，从一个抗血清制备对一个或少数几个决定簇专一的抗体，作为鉴别的手段。通常这是通过加一系列的、小量浓的细菌悬液到一个抗血清中，每次加细菌后，离心去除凝集的细菌，直到所有的交叉反应抗体被去除掉，抗血清已成为对所要求的抗原决定簇有选择专一性时为止。例如，把属于“A”族的 *S. paratyphi* A (1,2, 12) 加入到抗 *S. typhi* (属 D 族，决定簇为 9, 12) 的抗血清中(含抗-9，抗-12 抗体)。经过这样的吸附以后，就可以去除抗-12 抗体，而得到对决定簇 9 专一的抗血清，也就可以当作“D”族的专一的鉴别血清。

表 2-2　一些沙门氏菌“O”抗原之血清学因子和糖组成

血清型(种)	族	“O”因子	基本糖*之外的糖成分	化学型
*S. Paratyphi*A	A	1,2**,12	man Rha Par	XV
S. Paratyphi A var. *durazzo*		2,12	man Rha Par	
S. abortus equi	B	4,12	Man Rha Abe	XIV
S. paratyphi B		1,4,5,12	Man Rha Abe	
S. typhimurium		1,4,5,12	Man Rha Abe	
S. typhimurium(mutant)		1,4,12	Man Rha Abe	III
S. paratyphi C	C_1	6,7	Man	
S. cholerae suis		6,7	Man	
S. newport	C_2	6,8	Man Rha Abe	XIV
S. typhi	D	9,12	Man Rha Tyv	XVI
S. sendai		1,9,12	Man Rha Tyv	
S. enteritidis		1,9,12	Man Rha Tyv	
S. anatum	E_1	3,10	Man Rha	XIII
S. newington	E_2	3,15	Man Rha	
S. illinois	E_3	(3),(15),34	Man Rha	
S. senftenberg	E_4	1,3,19	Man Rha	
S. adelaide	O	35	Col.	X

* 基本糖成分：KDO，磷酸庚糖，氨基葡萄糖，半乳糖和葡萄糖。
Man = 甘露糖，Rha = 鼠李糖，Par. = Paratose, Abe. = Abequose, Tyv = Tyvelose Col = colitose
** 族特有的“O”因子，在序号数字下加一横线。(据 Kaufmann 等，1960)。

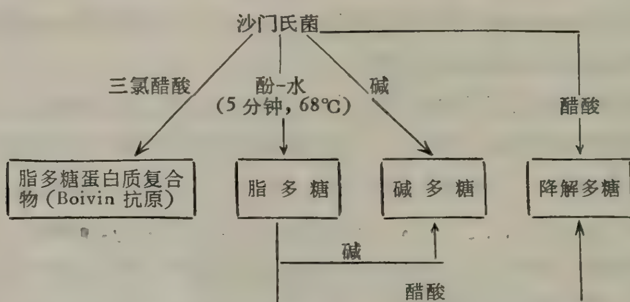


图 2-3　从沙门氏菌制备的各种具有“O”抗原专一性的提取物。

“O”抗原具有很强的毒性，极微量(0.001 微克/公斤体重)就能引起发烧，白血球减少等临床症状。由于这些物质是细菌细胞壁的组成成份，只有在细胞解体时才释放出来，因此又称为“内毒素”。“内毒素”与“O”抗原有密切关连，但“O”抗原专一性和毒素活力是可以分开的。当用酚:水溶液(45:55)在 68°C提取时，从水相可以分离出高分子量的脂多糖 (Lipopolysaccharide，简称 LPS)，仍有毒性。若再经 0.1 N 醋酸水解(100°C，2 小时)，就可以得到无毒性的多糖，并保持“O”抗原专一性(图 2-3)。由此可见，“O”抗原专一性存在于此多糖部分，而毒性可能存在于类脂物部分。这种多糖经纯化后广泛地用于结构和免疫化学的研究。

1. “O”抗原专一性的结构基础

(1) 特异的糖组成和“化学型”

如上所述，沙门氏菌的分类主要根据“O”抗原专一性。对不同血清型沙门氏菌的近

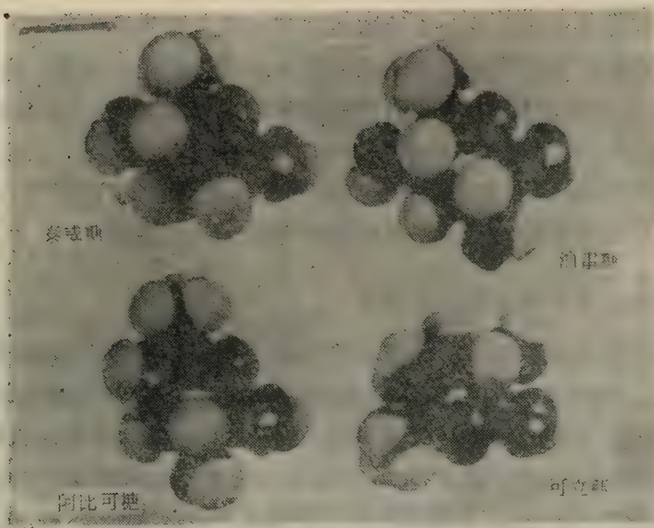


图 2-4　四种脱氧己糖的分子模型(据 Kabat 和 mayer, 1961)。

一百种“O”抗原进行的化学分析，发现“O”抗原是由五到八种单糖成分组成的、结构复杂的多糖。然而毫无例外地，所有沙门氏菌的“O”抗原都含有五种共同的糖成分：磷酸庚糖，Ketodeoxyoctonic acid（KDO），D-葡萄糖，D-半乳糖和 D-氨基半乳糖。除去上述五种基本糖成分以外，每一个血清型(种)又可能含有一到三种为各物种特异的糖成分。最特别的，许多沙门氏菌发现存在一类新的糖，3,6-双脱氧己糖，可分为四种：3,6-双脱氧-D-甘露糖（泰威糖 Tyvelose）；3，6-双脱氧-D-半乳糖（阿比可糖 Abequose）；3,6-双脱氧-L-半乳糖（可立糖 Colitose）和 3,6-双脱氧-D-葡萄糖（泊雷糖 Paratose）。一个特定的血清型(种)具有其中一种特异的双脱氧糖，位于脂多糖链的非还

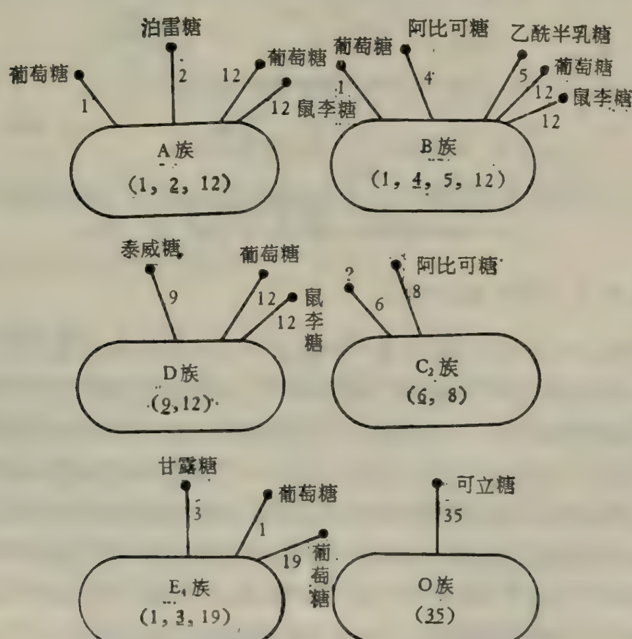


图 2-5　用血清学抑制实验测定的和沙门氏菌的一些“O”因子专一性有关的糖(据 Lüderitz 等,1966)。

原末端，并且是免疫优势基团。图 2-4 为这四种双脱氧己糖的分子模型，彼此的形状有明显的差异。这或许可以解释为什么它们可能起免疫优势基团的作用。由于各种沙门氏菌除基本糖成分外，还含有特异的糖组成(尤其是特异的双脱氧糖)。这种特异的糖组成，称为化学型（Chemotype）（图 2-5；表 2-2）。从表列举的材料可见，化学型和血清型的区别在分类上是平行的，因而也可作为分类的参考。然而，血清型的专一性不只是在于其糖的特异组成，更为重要的是这些糖单位在多糖链上的一定排列顺序。

(2) “O” 抗原的基核和侧链的一般构造

天然沙门氏菌在琼脂培养基上的菌落是光滑的，有时也可能产生菌落“粗糙”的变异型（“R”-mutant)。虽然各种沙门氏菌除基本糖成分以外，还含有各种特异的糖组成，但是所有这些“化学型”不同的种产生的突变型（“粗糙型”）都只含有这五种基本糖成分，而失去原物种特异的“化学型”。因此，有人根据这一现象提出一个关于“O” 抗原构造的假说：所有沙门氏菌的“O” 抗原多糖都具有一个由五种基本糖成分构成的共同基核(Common core)，同时还有由物种特异的糖成分组成的侧链和它相连。侧链的构造又是由一连串含二到四种单糖组成的低聚糖重复单位相连而成的多糖链。侧链的特异的排列顺序决定抗原专一性。图 2-6 表示“O”抗原的基核和侧链的一般构造。

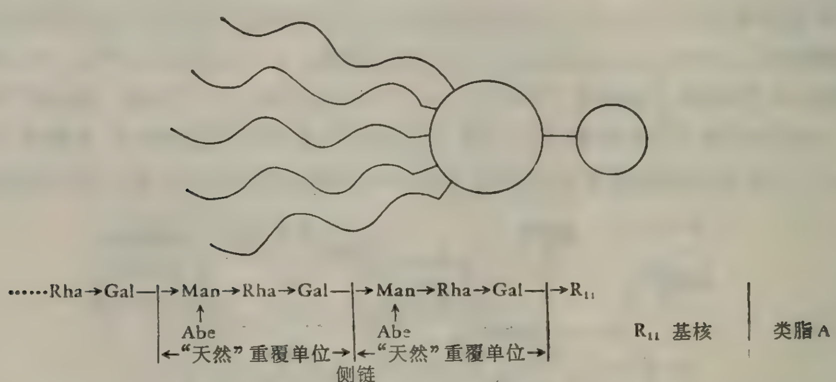


图 2-6 沙门氏菌“O”抗原（LPS 复合物)构造示意图及 *S. typhimurium* LT12 之专一的多糖侧链的构造(据 Lüderitz 等，1966)。

(3) “O” 抗原专一性的微细构造

LPS 多糖侧链特异的排列顺序是“O”抗原专一性的结构基础。对“O” 抗原决定簇的微细结构的进一步分析发现虽然在许多情形下，非还原末端(尤其是位于末端的 3，6-双脱氧己糖)是免疫优势基团，但是构成“O” 抗原专一性（“O” 因子）的糖残基，并不一定要位于侧链的末端，有时也可能是侧链内的某一个重复单位或其一部分(图 2-7)。不论其在侧链上的位置如何，所有这些决定抗原专一性的糖残基都有可能是免疫优势基团。

沙门氏菌的血清学分类上(表 2-2)，可见到不同的族可能有共同的抗原决定簇(“O” 因子)，并且常和另一族专有的“O” 因子相伴出现。例如，B 族中存在的决定簇 1，在 E_4 族总是和决定簇 19 一起同时出现。对这一现象的解释是这两种 “O” 因子的专一性是由侧链的同一段落决定的，不过它们所包括的长度(糖残基的数目)不同，因而这些专一性

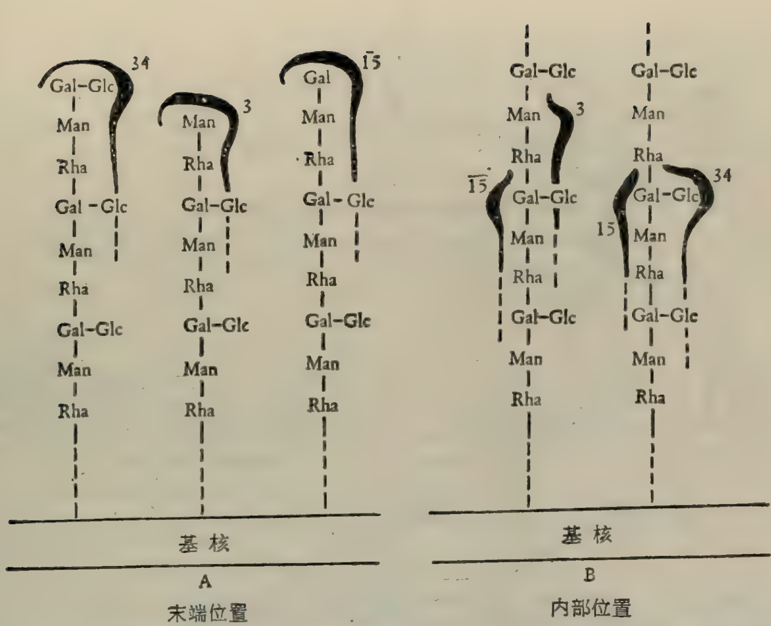


图 2-7 沙门氏菌 E_3 族(3,15,34)多糖侧链上决定簇("O" 因子)的可能位置。链周围的黑线示决定簇和抗体结合部位间之亲和力的强度，线越粗表示亲合力越强(据 Lüderitz 等，1966)。

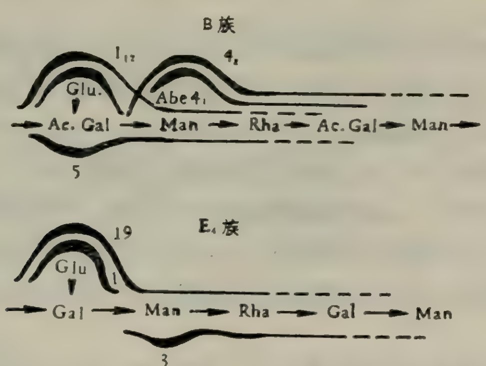


图 2-8 B 族多糖重覆单位上的 1，1_{12}，5，4_1 和 4_2 因子。E_4 族多糖重覆单位上的 1，3，19 因子(据 Lüderitz 等，1966)。

总是相伴出现，而又可以互相区别(图 2-8)。

2. 抗原专一性的溶菌转化

噬菌体感染沙门氏菌后，能引起"O"抗原专一性(血清型)的转变，原有的抗原决定簇减弱，同时出现新的决定簇。这种溶菌转化现象对于了解"O"抗原的化学结构和生物合成的遗传控制是很有启发的。

对 E 族沙门氏菌的一系列溶菌转化曾作过详尽的研究。从图 2-9 可见，E_1 族 (3，10) 被噬菌体 ε15 感染后，原有的决定簇 10 改变为 15，决定簇 3 没有改变。结果血清型发生转变，从 E_1 族转化成 E_2 族。E_2 族又可被另一种噬菌体 ε34 转变成 E_3 族，新产生一个决定簇 34，而原有的决定簇 3，14 保持不变。另一方面，E_1 族 (3,10) 被 ε34 侵袭后，E_1 的抗原特性最初保持不变。但是，当再受到另一个噬菌体 ε 15 作用时，就被转化

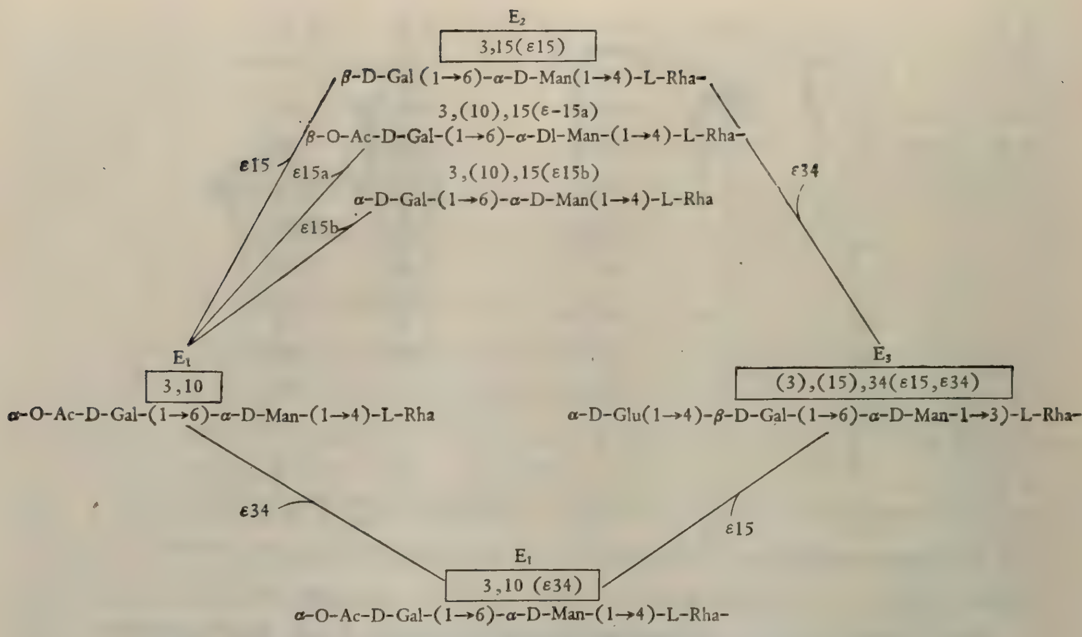


图 2-9　沙门氏菌抗原决定簇的溶菌转变(据 Uchida 等，1963)。

为 E_3 (3,15,34)。

图 2-9 还表示了噬菌体引起的血清型转化和抗原决定簇结构变化之间的关系。噬菌体 ε15 能引起出现一个新的酶系，使和“O”因子 10 的专一性相关的 O-乙酰-α-D-半乳糖基团转变成一个失去乙酰基的 β-D-半乳糖基团,后者是和“O”因子 15 的专一性相关的。还可以假定噬菌体 ε15 的遗传信息表现就是形成 β-D-半乳糖键，从而提供进一步在噬菌体 ε34 的作用下和 α-葡萄糖残基连接的受体。于是便可以解释 E_1 (3,10) 最先被噬菌体 ε34 侵袭时，不表现出溶菌转化，因为“O”因子 10 缺乏 α-葡萄糖残基的受体，而当再被 ε15 侵袭时，在两个噬菌体的协同作用下就能迅速表现出作用，转化成 E_3 (3,15,34)。

从噬菌体 ε15 还分离出两个突变品系 (ε15a 和 ε15b)，能将 ε15 的作用再分解为两步。ε15a 的溶菌转化作用是把 α-O-乙酰-D-半乳糖转变为 β-O-乙酰-D-半乳糖；而 ε 15b 则能使 (3,10) 决定簇失去 O-乙酰基团。在两种情形下，“O”因子 10 的专一性都被部分地抑制，而表现出“O”因子 15 的专一性。

总之，噬菌体引起的血清型转化是由于抗原决定簇微细构造改变的结果，如增加一个新的 α-葡萄糖残基，α-连接改变为 β-连接，(1→4) 连接改变为 (1→6) 连接等。这些改变是由于噬菌体可能引起出现新的酶系。至于这种遗传控制的变化是由于噬菌体基因组的作用，还是细菌本身基因去抑制的结果，则不得而知了。

3.“O”抗原决定簇生物合成的遗传控制及基核的构造

对许多“粗糙型”突变品系的 LPS 构造的比较研究，发现所有的突变品系都含有类脂 A，而其多糖所含的基本糖成分则呈现从 Ra 到 Rd 一系列的变化 (图 2-10)。另一个突变品系 Re，只含有 KDO，类脂 A 和乙醇胺，而不含任何糖。据此可以推论，从 Re 到 Ra 多糖链构造的这一系列变化反映了基核多糖链的构造及其逐步合成的阶段，每一

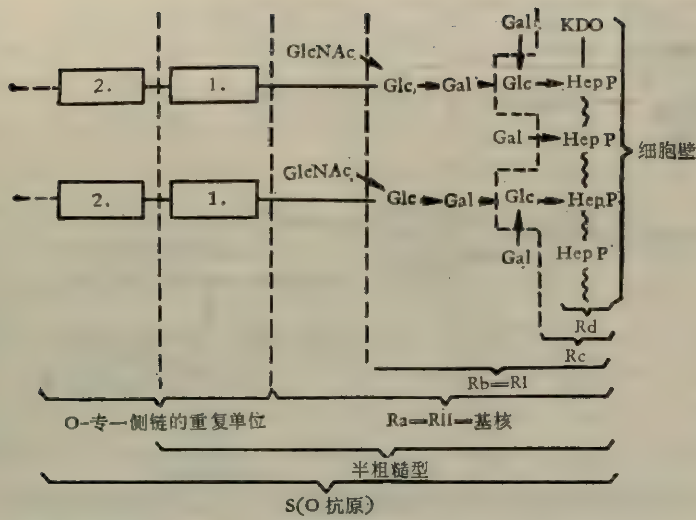


图 2-10 沙门氏菌光滑型和粗糙型之脂多糖的构造(据 Lüderitz 等，1966)。

步增加一个糖单位(图 2-11)。其中每一步都受一个基因控制。因此，当由于某一个基因突变而失去生物合成途径中某一中间环节的一个酶时，结果在此环节之后的合成作用就中断，多糖链的延长也就被阻止了。

对各种突变品系的 LPS 抗原决定簇之低聚糖的分离和构造测定，也证实了上述看法。如从 *S. minnesota* 的 Rb 突变品系分离出的一个 4 糖具有下述构造：

α-D-Gal
↓ 1
↓ 6
α-D-Glc→Gal→Glc

而从 Ra 突变品系得到的一个 5 糖则具有：

Gal
↓ 1
↓ 6
GlcNAc→Glc→Gal→Glc

的构造，和前者的唯一区别是在末端多加了一个 α-N-乙酰-氨基葡萄糖残基。

在缺乏半乳糖的培养条件下产生的“粗糙型” Rc 突变品系，其多糖组成只含有葡萄糖和庚糖。当培养基中加入半乳糖时，它就能合成完全的“O”抗原，并恢复形成光滑的菌落。这是由于这种突变品系缺少 UDP-半乳糖-4-差向异构酶（将

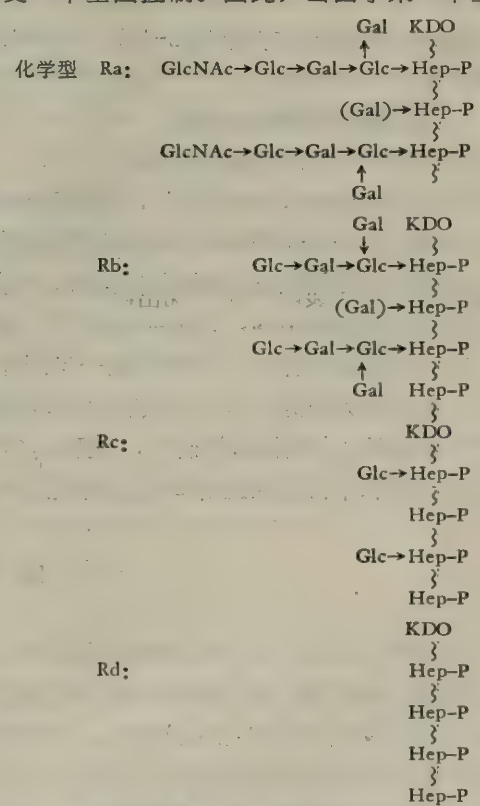


图 2-11 沙门氏菌“粗糙型”突变品系之“R”多糖的构造。KDO = 2-keto-3-deoxyoctonate; Hep-P = 磷酸庚糖（据 Lüderitz 等,1966)。

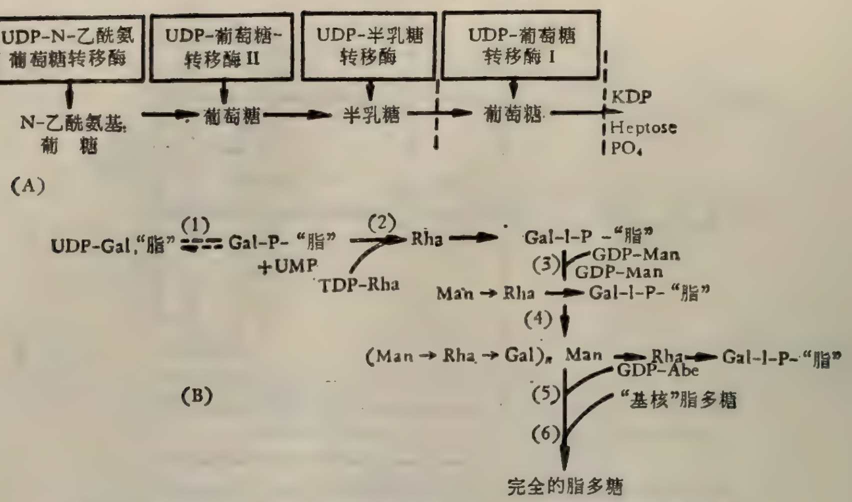


图 2-12 沙门氏菌 O-专一多糖的酶促合成。(A) 基核多糖的酶促合成。(B) *S. typhimurium* O-专一链的酶促合成(据 Wiener 等,1965)

UDP-葡萄糖转变成 UDP-半乳糖),因此它们自己不能合成半乳糖而依赖从环境中摄取。根据类似的一系列的突变品系的研究,阐明了"O"抗原侧链可能的合成途径,以及和 Ra 基核的连接方式(图 2-12)。图 2-12 说明"O"抗原多糖的合成途径主要分两个步骤:

1) 基核类脂多糖的合成;

2) "O"专一的侧链的合成。

以 *S. typhimurium* 为例,Man-Rha-Gal 重复单位的合成是在一个类脂受体上进行的。最先一个 UDP-Gal 和类脂受体起作用,连接成 Gal-1-P-类脂受体。然后,Rha-,Man-依次通过配糖键与其连接,再加上 Abe 侧链。许多这样的重复单位聚合后,再连接到基核上面,形成完整的"O"抗原。

对沙门氏菌各种"O"抗原的进一步研究,证实上述的抗原决定簇构造原则是普遍适用的。特别有兴趣的,"U"族具有血型 B 的抗原专一性,能和 B 血型物质起交叉反应。对"U"族抗原决定簇构造的研究,发现其"O"抗原决定簇具有 α-D-Gal-(1,3)-Gal-的构造。这是和下面要谈到的 B 血型物质的决定簇构造相似的。

(三) 血型抗原

"ABO"系统是人类最重要的血型系统。各型红血球(及其他细胞)表面均有相应的血型抗原存在,而血清中则存在着天然的抗 A 或抗 B 抗体。A 血型的人,红血球上有 A 型抗原,而血清中天然存在抗 B 抗体。B 血型的人,红血球上有 B 型抗原,而血清中天然存在抗 A 抗体。O 血型的人,红血球上 A、B 型抗原都不存在,而在血清中却同时存在抗 A 和抗 B。因此,在正常情形下,人体内红血球不会发生凝集现象,而在血型不配合的个体间输血时,就会发生凝集并引起严重的输血反应。"ABO"血型抗原是受三个等位基因 A,B,O 控制的。A,B 基因对 O 基因是显性的。基因型 AA 和 AO,或基因型 BB 和 BO,在血清学上没有区别,仍可按表型相应地划分为 A 型或 B 型。因此,虽然

存在六种基因型，实际上只存在四种表型(O,A,B,AB)，即四种血型。

红血球表面上的血型抗原是以糖脂的形式和膜结合的，因而分离上颇为困难。幸好在多数人(占人口80%)的消化道、生殖道等粘膜面的分泌液(唾液、胃液、卵巢滤泡液等)中，都含有相当于红血球表面血型抗原的可溶性血型物质，能较为方便地提取出来。从A血型的人可提取出A血型物质；从B血型的人可提取出B血型物质；从AB血型的人可提取出A、B血型物质；从O型的人，则可提取出H血型物质。后者被认为是A、B血型物质生物合成的前体物。A、B、H血型物质的分泌是受分泌基因(Se)控制的。人类80%个体能分泌血型物质，称为"分泌者"，其余20%不分泌，称为"非分泌者"。这些不分泌"ABO"系统血型物质的个体，能分泌另一种血型物质，称为Le^a、Le^a是不同于"ABO"的一个新血型系统，受另一个独立的基因系统(Le)控制。总之，这几种血型抗原(A、B、H和Le^a)是受三个独立的基因系统(ABO，Se，Le)控制的。有人假定每一个基因决定一个糖基转移酶，并专一地把一个单糖残基按照一定的顺序依次连接到共同前体物上去，从而形成这几种不同的血型物质。对血型物质的抗原结构和专一性的研究结果，支持这一假说。

1. 血型物质的抗原构造和专一性

所有纯化的血型物质都是高分子量的糖蛋白，分子量介于200,000—1,000,000之间。人类血型物质都含有4种糖成分：L-岩藻糖，D-半乳糖，D-氨基葡萄糖和D-氨基半乳糖；并含有相同的11或12种氨基酸，其中Pro，Ser，Threo含量较丰富。

应用半抗原抑制抗原抗体反应的方法，阐明了血型物质的免疫学专一性决定于多糖链末端的排列顺序。在血型物质A和抗A反应系统中，利用A、B、H和Le^a物质所含的各种单糖成分作抑制实验，表明其中只有N-乙酰-D-氨基半乳糖(简称α-D-GalNAc)呈现明显的抑制效应。同样地，在B和抗B反应系统中，只有半乳糖(简称α-D-

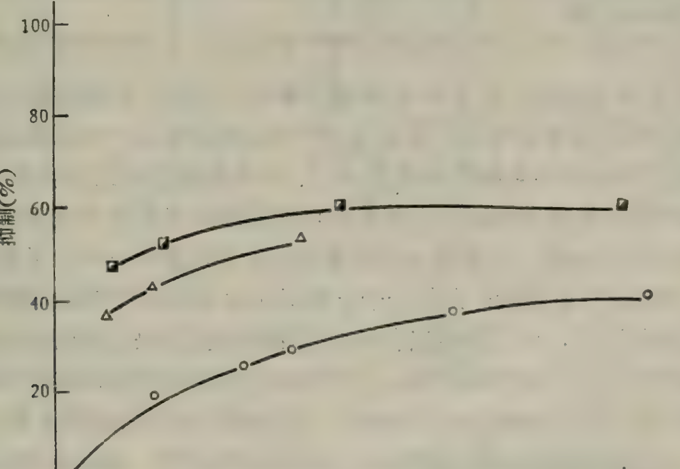
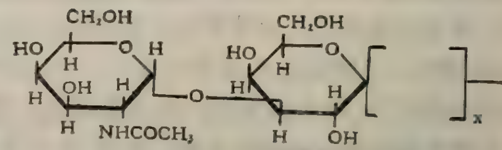
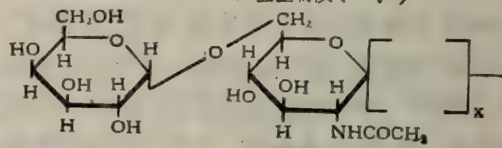
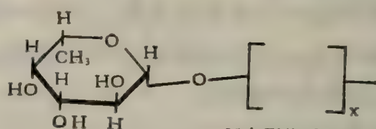
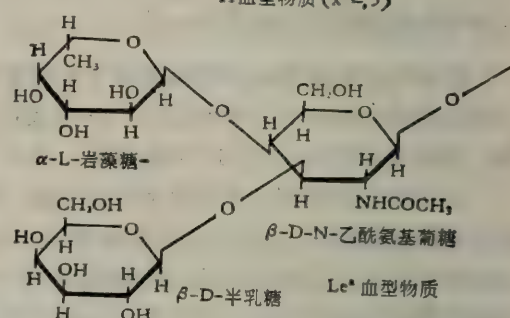


图2-13 各种糖对抗-B-抗血清和B-血型物质沉淀反应的抑制。(■)甲基-α-D-半乳糖苷；(△)D-半乳糖；(○)甲基-β-D-半乳糖苷；(■)L-岩藻糖；(■)N-乙酰-D-氨基葡萄糖；(■)N-乙酰-D-氨基半乳糖(据Kabat和Leskowitz，1955)。

表 2-3　人类血型物质专一性的决定簇

抗　原	抗 血 清	决　定　簇	决 定 簇 化 学 式
人类"A"	人抗"A"	α-N-乙酰氨基半乳糖(1→3)半乳糖	 A 血型物质 (x≒4)
"B"	抗"B"	α-D-半乳糖(1→6)乙酰氨基半乳糖	 B 血型物质 (x≒4)
"O"	抗"H"（鳗血清）*	L-岩藻糖	 H 血型物质 (x≒5)
人类"Le^a"**	人抗"Le^a"	β-D-半乳糖(1→3)} D-N-α-L-岩藻糖(1→4)} 乙酰氨基葡糖	 Le^a 血型物质
人类血型物质降解产物	XIV 型肺炎球菌的马抗血清	氨基葡萄糖	

* 鳗鱼血清天然含抗"H"。

** 由唾液中无血型物质分泌的人提取出是由与"ABO"系统无关的 Se 基因决定的(据 Boyd, 1962)。

Gal)；在 H 和抗 H 系统中，只有 L-岩藻糖（简称 L-Fuc）表现明显的抑制作用。进一步研究还发现在 B 和抗 B 系统中，甲基-α-D-半乳糖苷对这一抗原抗体系统的沉淀反应的抑制能力要比甲基-β-半乳糖苷强得多，并且 D-半乳糖也要比后者强(图 2-13)。由此推论，B 血型物质多糖链末端第二个糖单位可能是通过半乳糖 α-配糖键连接的。后来，从 B 血型物质水解产物中，分离出一个双糖（α-D-半乳糖-(1→3) 半乳糖)，其抑制能力比甲基-α-D-半乳糖苷还要强；另外一个三糖又比此双糖的抑制能力更强。通过系统地运用这种方法进行研究，终于测定出各种血型物质的抗原决定簇的结构，列于表 2-3。

上述用免疫化学方法得到的结果，也得到血型物质逐步酶解实验结果的有力支持。当用某些细菌（如 *Trichomonas foetus*）或动植物（蜗牛、咖啡豆等)的专一酶来逐步切断 A 或 B 血型物质多糖链的末端时，血型物质的抗原专一性就发生顺序性变化（图 2-14）（Watkins, 1966）。从图 2-14 可见，A,B 血型物质在专一的酶作用下，各自失去一个末端糖残基后，都转变为 H 物质的抗原专一性；而后者被酶解，失去一个岩藻糖后，就转变为 Le^a 物质；当再失去一个岩藻糖时，最后转变成一个具有 XIV 型肺炎球菌抗原专一性的共同前体物。逐步酶解时表现出的这种顺序性变化，提示 A、B、H、Le^a 抗原决

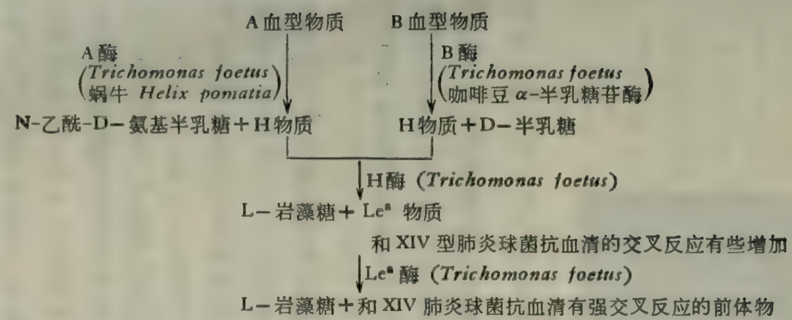


图 2-14　血型 A 和 B 物质的逐步酶解。每一个酶去除一个末端免疫优势糖残基，并显现出一个新的决定簇（Watkins，1966）。

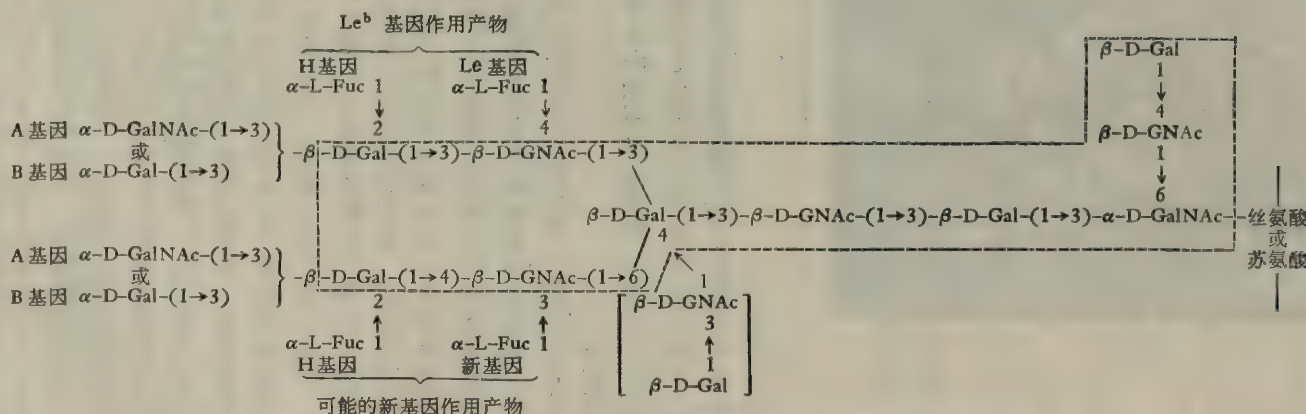


图 2-15　人 A，B，H，Leª 和 Leᵇ 血型物质的多糖链和有关基因的关系复合图。靠近丝氨酸处有另一侧链。方括弧内的侧链可能存在，但尚未证实（据 Kabat，1976）。

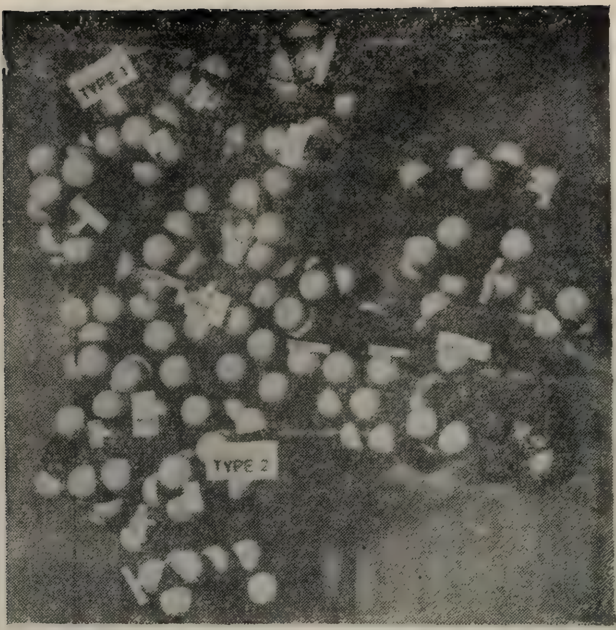


图 2-16 人A血型物质的分子构造模型(据 Kabat, 1976)。

定簇在构造上的关联。

根据上述逐步酶解和酸水解得到的低聚糖片段的分析等方面系统研究的结果，Kabat 提出一个关于人 A,B,H,Le^a 和 Le^b 血型物质多糖链和抗原决定簇结构的关系的复合图(图 2-15)，以及血型物质 A 的分子构造模型(图 2-15)（Kabat，1970；1976；Lloyd 等，1968）。

从图 2-15 上可见，虚线框内的分叉的多糖链*通过丝氨酸或苏氨酸和多肽骨架连接起来。 这一分叉的多糖链是 A,B, H 和 Le^a 血型抗原共有的结构，在血清学上和 XIV 型肺炎球菌有交叉反应。此共同前体物的叉链末端的糖残基连接不同的糖残基时，便衍生出不同的血型抗原。如叉链末端的第二个糖残基（-β-D-GNAc-）通过 α(1→4) 配糖键连接一个岩藻糖时，便转化成"Le^a"物质。 叉链末端的半乳糖残基（β-D-Gal）通过 α(1→2) 配糖键连接一个岩藻糖时，则转化为"H"物质。若在上述两位置同时连接两个岩藻糖时，便转化成"Le^b"物质。"H"物质叉链末端的半乳糖通过 α(1→3) 配糖键如连接一个乙酰氨基半乳糖（α-D-GalNAc-）则转化成"A"物质；如改为连接一个半乳糖，则转化为"B"物质。根据上述的血型抗原结构复合模型，就可解释当用酶逐步切断多糖链末端时，发生的抗原专一性的顺序性变化了。

在了解血型物质的抗原结构以后，就可以再回到前面提到过的血型抗原的专一性和决定簇的空间构象的关系问题。 已经知道， 多糖链末端的 N-乙酰-D-氨基半乳糖是 A 血型抗原的免疫优势基团，而多糖链末端的双糖 α-D-GalNAc-(1→3)-Gal 和三糖 α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Gal-(1→3)-GNAc 对 A 和抗 A 反应系统的抑制能力，依次递增。这从上述的血型物质的结构看来是容易了解的。可是，有人发现一个四糖（AR_L

* 血型抗原糖蛋白上的多糖链是不均一的，由于遗传组成不同或合成不完全以及其他未知的原因而长短不齐。此图中只是例举一种可能的构造。

0.52)：

α-L-Fuc-1
↓
2
α-D-GalNAc(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-D-GNAc-R

含有一个末端 α-L-Fuc 侧链和上述三糖相连。 它对 A 和抗 A 反应的抑制能力却比此三糖还要高。这一现象就有一些费解了。为了解释这种抑制能力增高的现象，首先可以假定“A”血型抗原专一性还依赖包括 α-L-Fuc 和 α-D-GalNAc的叉链决定簇。倘若这一假定成立，则缺少末端的一个 α-D-GalNAc 残基的AR 0.52 低聚糖（也就是相当于“H”物质尾段的低聚糖）对 A 和抗 A 反应系统也应当表现一定程度的抑制。 事实却并不是这样。显然，这一假定是不能成立的。 另一种可能的假定是 L-Fuc 侧链本身并不参与抗原决定簇的构成，但此侧链的存在能使三糖保持一个固定的构象，而抗 A 抗体的结合专一性是和此构象互补的。 这一假定受到下述事实的支持：和 AR_L 0.52 相同的构造，在 N-乙酰-D-氨基葡萄糖残基（β-D-GNAc）位置多连接上第二个 Fuc 残基，有了这种构造的低聚糖的抑制能力便降低了。 从空间模型可见，第二个岩藻糖残基的存在，可能阻碍了为第一个岩藻糖残基所稳定的三糖抗原决定簇和抗 A 抗体结合部位的接近。因此，A 血型物质的抗原专一性可能依赖决定簇的空间构象。

2. 血型抗原生物合成的遗传控制

根据 ABH 和 Le 血型物质的化学结构和抗原专一性转化的分析，提示各种血型物质的生物合成是一系列基因对共同的多糖链前体物按顺序作用的结果。已知 ABH 和 Le 血型物质的合成和分泌是受三个独立的基因系统 Le、Se、ABO 的活动控制的。对 Le、Se、A、B 基因功能的简单的解释是假定每一个基因控制一个专一的糖基转移酶的产生和活动，将一个特定的糖按照一定的连接方式，加到预先形成的多糖链的末端，或生成一个叉链，从而产生一个新的血型抗原专一性。这种新出现的专一性主要是由新加上的糖残基决定的，不过在空间构象上也可能依赖原先存在的多糖链的顺序和键的性质。这种

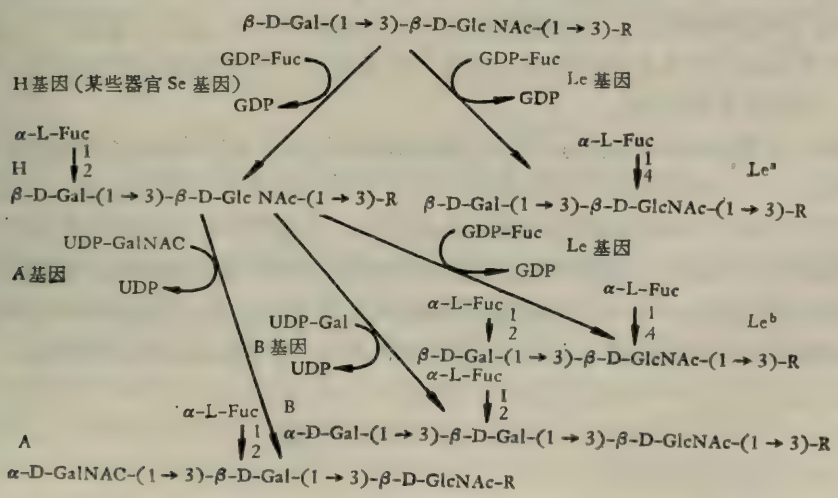


图 2-17 在专一基因控制的糖基转移酶的作用下，A，B，H，Leᵃ 和 Leᵇ 决定簇的生物合成的步骤(录自 Kabat, 1976)。

新的抗原专一性又可能被在另一基因作用下新加上去的另一个糖残基掩盖，同时出现另一个新的抗原专一性。由于一系列基因按照一定的顺序性所起的一系列转化作用的结果，从共同的前体物便衍生出各种血型物质。这些基因的等位基因 le，se 和 o 是隐性的，缺少这种转化能力。从控制血型物质合成来说，可认为是不活动的（Morgan，1960，1970；Watkin，1962，1972）。

从图 2-17 可见，血型抗原的共同多糖链是由两种类型的低聚糖支链联合形成的叉链结构。1 型支链具有：β-D-Gal-(1→3)-β-D-GNAc-的结构；2 型支链具有：β-D-Gal-(1→4)-β-D-GNAc-的结构。1 型和 2 型支链又是分别通过 β（1→3）和 β(1→6) 配糖键的方式和半乳糖连接形成一个叉链结构：

```
β-D-Gal-(1→3)-β-D-GNAc
                   │1
                   ↓3
              β-D-Gal-
                   ↑6
                   │1
β-D-Gal-(1→4)-β-D-GNAc
```

这一叉链构造又和下列低聚糖：

```
β-D-Gal
   │1
   ↓4
β-D-GNAc
   │1
   ↓6
α-D-GalNAc-Thr 或 Ser
```

的 GalNAc 直接连接，从而通过后者，又和多肽骨架上的苏氨酸或丝氨酸连结。这样就形成了血型抗原共有的多糖叉链结构(图 2-14 虚线框内的结构)。

这种血型抗原共同的叉链结构的 1 型和 2 型支链决定簇可作为受特定基因控制的糖基转移酶的受体，在专一酶的作用下依次连接上适当的糖残基，从而构成 A，B，H 和 Le^a 血型物质的优势抗原决定簇。图2-17表示在专一基因控制的糖基转移酶的作用下，A、B、H、Le^a 和 Le^b 决定簇的生物合成步骤。图中所示的受体是以 β（1→3）方式连接的 1 型支链。2 型支链上 H，A，B 决定簇的合成大体上亦复如此。唯一的区别是在 Le^a 决定簇形成时，糖基转换酶是把岩藻糖连接到 2 型支链的 GNAc 的第 3 碳原子上，而不是象在第 1 支链是连接在第 4 碳原子上。因此，应当有另一个新的基因参与作用，有关的血清学专一性尚未鉴别出来。

最后，还要提到 AB 血型，A、B 基因都同时存在。有人假定它们各自决定的两种酶，可能竞争共同的多糖链，结果在同一分子上同时形成 A 和 B 的抗原决定簇。至于各型红血球表面的抗原结构将留待第四章中讨论。这里顺便还要提到的是对于血型抗原的结构及其合成的遗传控制的阐明，提供了改变红血球血型的可能性。目前已有人利用 B 型人唾液中含有的 α-D-半乳糖基转移酶处理人 O 型红血球，在酶的专一作用下能使O型红血球转化为有 B 型抗原活力的红血球（Kogure 和 Furukawa，1976）。

(四) 异嗜性抗原

彼此无血缘关系的动物、微生物的细胞和体液内，存在一类抗原，它们的抗原性很相近，以致其中任一种抗原的抗体能对这一类的其它抗原起强烈的交叉反应。这一类抗

原总称为异嗜性抗原（Heterophil antigen）。最著名的例子是 Forssman 抗原，它存在于许多种动物红血球和其他组织细胞内，以及某些细菌，如肺炎球菌、痢疾、伤寒、副伤寒的某些菌株（可能为细胞壁成分）。另一方面，不含 Forssman 抗原的动物（如人、大鼠、兔）的体液内存在异嗜性抗体，能使含 Forssman 抗原的动物（绵羊、马、豚鼠）的红血球凝集。各种 Forssman 抗原有相似的决定簇，可能为一个脂多糖复合物，并和一个蛋白质松散地结合。脂多糖部分能起半抗原的作用，称为 Forssman 半抗原。

近年来，从大量羊红血球分离出经硅胶薄板层析鉴定为高度纯化的 Forssman 半抗原。其化学性质为一种脂多糖，其糖部分含有半乳糖、葡萄糖和氨基半乳糖（2∶1∶1）。类脂部分含有双氢鞘氨醇（Dihydrosphingosine）、神经酸（Nervonic acid）、廿四烷酸（Lignoceric acid）和山萮酸（Behenic acid）（Mallete 和 Rush，1972）。最近，Fraser 和 Mallete 改进了提取和分离方法，进一步证明羊红血球 Forssman 半抗原的多糖部分的构造为：N-乙酰氨基半乳糖—（α1→3）—N-乙酰-氨基半乳糖—（β1→3）—半乳糖—（α1→4）—半乳糖—（β1→4）—葡萄糖—（β1→1）脑脂胺（Ceramides）（图 2-18）。其类脂部分的组成仍和从前报告的相似（Fraser 和 Mallette，1973，1974；Ziolkowski 等，1975）。

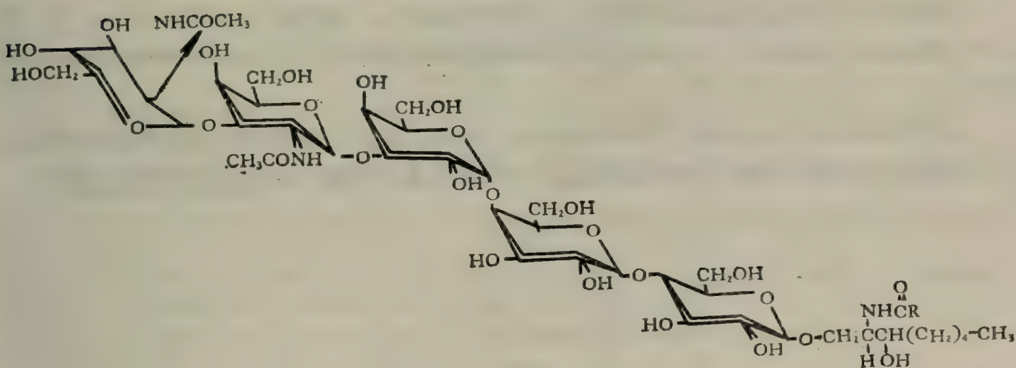


图 2-18 羊红血球 Forssman 半抗原的构造。R = $C_{23}H_{47}$—（lignoceric acid）廿四烷酸，$CH_3(CH_2)_7\overset{H}{C}=\overset{H}{C}(CH_2)_{13}$—神经酸，或 $C_{21}H_{43}$— 山萮酸（据 Fraser 和 Mallette，1974）。

某些细菌的异嗜性抗原和人类血型物质有共同的抗原性。如前述，沙门氏菌“U”族，以及大肠杆菌（086）的“O”抗原能和血型物质“B”有交叉反应；抗痢疾杆菌的山羊抗血清和血型物质“H”有交叉反应；肺炎球菌 XIV 型的荚膜多糖和血型物质“A”或其它血型物质降解产物有交叉反应，如此等等。有人根据这些事实来解释人类血清中天然同族凝集素（Isoagglutinin）的起源，假定它们是在婴儿期肠道或呼吸道受带有 A、B 血型抗原专一性的细菌刺激而产生的无耐受性的抗体（如血型 A 的人产生抗 B 抗体，如此等等）。在无菌动物（小鸡、小猪）上的实验似乎也支持这一假定。正常带菌的小鸡和小猪很早就能产生抗 B，而无菌动物则不能。然后，若对无菌动物喂大肠杆菌（086）（血

型 B 抗原专一性的异嗜性抗原)，很快就产生抗 B 抗体，并且这种异嗜性抗体存在于血清的巨球蛋白 (19 S) 部分，与正常红血球凝集素相同。

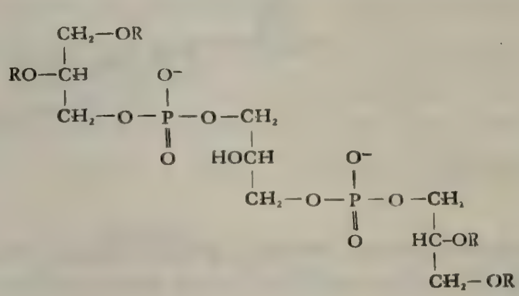
除去理论上的兴趣以外，异嗜性抗原系统在医学实践上也有其重要性。因为，一方面它们可能混淆某些血清学诊断；另一方面，在某些情形下又可能有助于鉴别诊断。后一情形的例子，如伤寒的 Weil-Felix 反应 (B. proteus 凝集反应)；原发性非典型肺炎链球菌 MG 菌株的凝集反应；以及传染性单核球增多症的 Paul-Bunnell 反应，在这种病人能产生和羊红血球的耐热性抗原（和牛的细胞，而不和豚鼠肾脏细胞共有的一种 Forssman 抗原）反应的抗体。这些反应对于上述疾病的鉴别诊断是有价值的。

二、类 脂 物

类脂分子由于分子量小，无固定的构型，免疫原性弱。另一方面，它们易被体内其他物质吸附而起半抗原的作用。上述 Forssman 半抗原就是一个著名的例子。目前还没有任何纯化的类脂物被证明单独具有免疫原性。虽然从 *M. pneumonia* 提纯的一种糖类脂能表现很弱的免疫原性 (Razin 等，1970)，一般说来，类脂物必须加载体蛋白质，合成多肽或与红血球结合后，才能引起对类脂物的抗体。不过，临床上也有人报告，某些中枢神经系统疾患的病人血清中存在天然的抗神经节苷脂的抗体。

研究最多的类脂半抗原是心脏类脂 (Cardiolipin)。梅毒病人产生的抗体，在一定条件下能和心脏类脂起专一反应，可作为梅毒血清学检定的方法，称为 Wassermann 反应。

心脏类脂在许多动、植物组织内都有存在，通常是从牛心提取的。其基本化学构造是三个甘油分子和两个磷酸二酯相连而成。甘油的羟基可能被不饱和脂肪酸 (R) 酯化：



另一类重要的类脂半抗原是细胞类脂 (Cytolipin H)，它是从人表皮癌提取出的一种糖类脂，为鞘氨醇的一种衍生物：

$$CH_3—(CH_2)_{12}—CH═CH—CH(OH)—CH(NH_2)—CH_2OH$$

其氨基和脂肪酸相连，而末端的羟基可被单糖或双糖(乳糖)取代，糖残基决定其半抗原专一性。类脂物由于在水中的溶解度很有限，因而在测试其半抗原活力的系统中，除非加其他辅助的类脂物(如卵磷脂、胆固醇) 使其乳化，否则无活力。在这种条件下，才能产生絮状反应或补体结合反应。据对许多类脂半抗原系统的研究结果，补体固定反应较其他方法更好。因此，这也就是 Wassermann 反应采用的方法。

参 考 资 料

多糖和含多糖抗原

专著和综述

Boyd, W. C. (1962). Introduction to immunochemical specificity, Intersciences.

Kabat, E. A. (1976). Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, 2nd. ed., Holt, Rinehart and Winston.

Kabat, E. A. and Mayer, M. M. (1961). Experimental Immunochemistry. 2nd ed., Charles. C Thomas. Sprinfield, Illinois.

Hakomori, S. I. and Kobata, A. (1974). Blood Group Antigens. In: "The Antigens," Vol. II., p. 79, Academic Press.

Morgan, W. T. T. (1960). Croonian lecture: A contribution to human biochemical genetics, the chemical basis of blood group specificity. Proc. Rey. Soc. B 151, 308.

Lüderitz, O., Saub, A. M. and Westphal, O. (1966). Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related enterobacteriaceae. Bact. Rev. 30, 192.

Lüderitz, O., et al. (1973). Lipid A: Chemical structure and biological activity. In: "Bacterial Lipopolysaccharides," Kass. E. H. & Wolff, S. M. ed., Chicago University Press.

Pardoe, G. I (1971). Genetics and immunochemistry of blood group antigens. Med. Lab. Tech. 28 1.

Watkins, W. M. (1966). Blood group substances. *Science* 152, 171.

Watkins, W. M. (1972). Blood group specific substances. In: "Glycoproteins", Part B p. 830, ed. Gottsschalk, A., Elsevier, Publ. Co.

论文

Kabat, E. A. (1966). The nature of an antigenic determinant. *J. Immunol.* **97**, **1**.

Kabat. E. A. (1970). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **169**, 132.

Kogure. T. and Furukawa, K. (1976) Enzymatic conversion of human group O red cells into group B active cells by-D-galactosy-transferases of sera and salivas from group B and its varient types *J. Immunogenltics* **3**, 147.

Lloyd, K. O., Kabat E. A. and Lierio. E. (1968). Immunochemical studies on blood groups. XXXVIII *Biochemistry* **7**, 2976.

Morgan, W. T. J. (1970). Molecular aspects of human blood-group specificity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **169**,118.

McCarty, M. (1964). The role of D-alanine in the serological specificity of group A streptococcal glycerol teichoic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **52**, 259.

Nikaido, H., et al. (1966). Biosynthesis of O-antigenic polysaccharides in Salmonella. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **133**, 299.

Robbins, P. W. and Uchida, T. (1962). Studies on the chemical basis of the phage conversion of O-antigens in the E-group Salmonella. *Biochemistry* **1**, 323.

Stellner, K., Lüderitz. O. Westphal O. and Stoub, A. M. (1972). Immunochemical studies on Salmonella. serological specificity of 2-O-acetylabequose and the production in rabbits of anti-S antibodies with artificial antigens. *Ann. Inst. Past.* **123**, 43.

Uchida, T.. Robbins. P. W. and Lauria, S. E. (1963). Analysis of the serologic determinant groups of the Salmonella group E antigens. *Biochemistry* **2**, 663.

类 脂

Fraser, B. A. and Mallette, M. F. (1973). An improved isolation method and new composition data for Forssman hapten from sheep erythrocytes. *Immunochemistry* **10**, 745.

Fraser, B. A. and Mallette, M. F. (1974). Structure of Forssman hapten glycosphingolipid from sheep erythrocytes. *Immunochemistry* **11**, 581.

Mallette, M. F. and Rush, R. L. (1972). Isolation and composition of Forssman hapten from sheep erythrocytes. *Immunochemistry* **9**, 809.

Rapport, M. M. (1961). Lipid haptens of animal cells. *J. Lipid Res.* **2**. 25.

Ziolkowski, C. H. J., Fraser, B. A.. and Mallette, M. F. (1975). Sheep erythrocyte Forssman hapten, an isohapten system: composition of the ceramide. *Immunochemistry* **12**, 297.

第三章 核 酸

核酸是荷载遗传信息的大分子。核酸结构和功能的研究已经相当广泛深入。但是，其免疫学方面的研究，直到最近几年才取得较大的进展。核酸抗原性研究的困难，首先在于分离和纯化，很难完全去除蛋白质和多糖的混杂。其次，核酸分子的电荷密度高，容易与蛋白质相互作用产生非专一的反应。此外，核酸的化学结构（核苷酸排列顺序）和空间构象的研究比蛋白质发展迟，也是重要的原因。

DNA 分子是由两条多核苷酸链，互相盘绕形成的一个双螺旋构造。每一条多核苷酸链是一条很长的多聚脱氧核糖磷酸骨架，其上有四种碱基（A、T、G、C）通过脱氧核糖而与磷酸基团连接。碱基排列顺序决定遗传信息。双螺旋的两条链间存在一条大槽和小槽。碱基朝向螺旋的中心，埋于槽内，而负电性强的磷酸二酯骨架则朝向外方。螺旋构象主要是靠碱基堆集的疏水力和碱基对之间的氢键维持稳定的（图 3-1）。DNA 的抗原性和这种结构特点有密切的关系。

RNA 分子含有核糖和四种碱基（A,U,G,C）。RNA 的二级结构没有 DNA 研究得那样清楚。有三类 RNA，即核糖核蛋白体 RNA（r RNA），信使 RNA（m RNA）和转移 RNA（t RNA），可能各不相同。rRNA 和某些病毒的 RNA 分子也可能含有不完全的双螺旋区域(图 3-2)。最近，对已知碱基排列顺序的 t RNA 的 X 射线衍射研究结果表明，不但存在双螺旋结构，而且有固定的空间构象(图 3-3)（Robertus 等,1974）。

经过近廿年的研究，核酸具有抗原性和免疫原性已是肯定无疑的了。天然的抗DNA抗体，最先是 1957 年在一种自体免疫病——全身性红斑狼疮（SLE）病人血清中发现的。后来，用实验方法也能在几种实验动物上引起抗 DNA 抗体。一般说来，不论用什

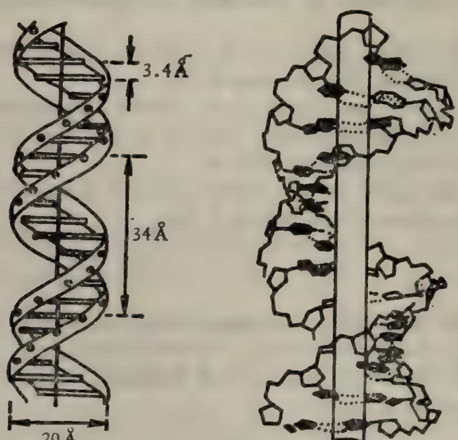


图 3-1 （左）Watson 和 Crick 设计的 DNA 分子模型图。二条带表示磷酸糖链，横棍表示连接两条链的碱基对。（右）DNA 螺旋的模型图，虚线表示连接碱基的氢键。

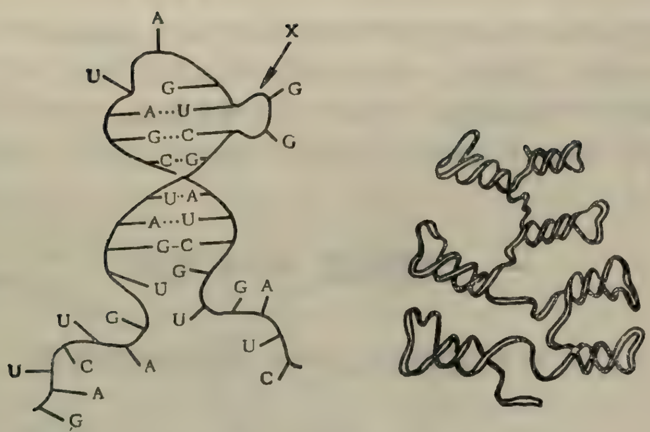


图 3-2 RNA 的二级结构。(右)表示在一条多核苷酸链中有好几个螺旋区(据 Spirin, 1963)。(左)示它具有互补的碱基配对的螺旋区。X处表示螺旋的突环部分(据 Fresco, 1963)。

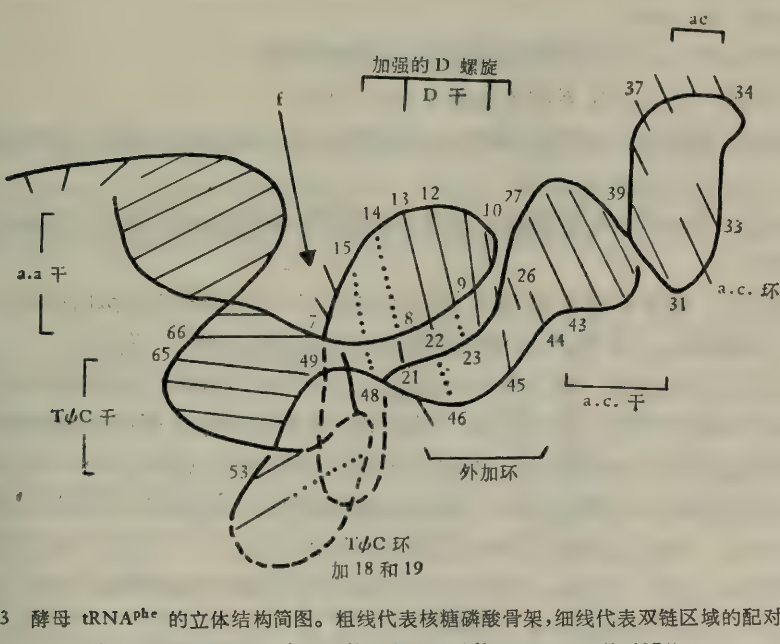


图 3-3 酵母 tRNA^{phe} 的立体结构简图。粗线代表核糖磷酸骨架,细线代表双链区域的配对碱基。(a. a 干)氨基酸干 (a. c 干)反密码子干(据 Robertus 等,1974)。

么免疫原,诱导出来的抗 DNA 抗体都和变性 DNA(单链)的反应强。仅和天然 DNA 反应的抗体,迄今为止只有在一些 SLE 病人血清中,以及 NZB/W小鼠类似 SLE 病的血清中发现过(Avara 和 Seligman, 1966; Povrenny 等, 1966)。试图用实验方法得到抗天然 DNA 抗体的实验,至今都未成功(Stollar, 1970, 1973; Tan 和 Natali, 1970)。这可能是和上述的 DNA 结构特点有关。天然 DNA分子中,碱基位于双螺旋的沟槽内,不能和抗体发生结合反应,因为抗体的结合位点也是一条沟槽,只能识别分子的突出部分。只有当变性时,碱基才能朝向水溶液,呈现出有效的决定簇(图 3-8)。另

一方面，双链 RNA 抗体不但天然就存在着，而且很容易用实验方法产生（Stollar，1970）。近来用各种合成的多核苷酸链作免疫原研究的结果，发现核酸的抗原专一性主要依赖空间构象，特别是二级结构。一级结构与抗原性也有些关系，但不那么严格。

关于核酸抗原性研究进展情况，可参看下列专著和综述：Levine 和 Van Vunakis（1967），Levine 和 Stollar（1968），Plesia 和 Braun（1967），Stollar（1973）。

一、天然的抗 DNA 抗体

（一）SLE 血清中抗 DNA 抗体存在的证明

1957 年几个实验室用不同的方法（沉淀反应、被动血凝反应和补体固定反应）差不多同时发现，一种自体免疫病——全身性红斑狼疮（Systemic Lupus Erythematosus，简称 SLE）病人血清中存在天然的抗 DNA 抗体（Seligman，1957；Miescher 等，1957；Robbins 等，1957）。

SLE 血清和 DNA 反应是专一的免疫学反应的证据：

1）抗原纯度　加入反应系统的抗原为纯的 DNA；

2）对酶解的易感性　抗原经 DNA 酶处理失去免疫学活性，RNA 酶和蛋白酶处理则无影响；

3）免疫复合物中 DNA 的回收　从反应系统产生的免疫复合物沉淀中，能全部回收所加入的 DNA；

4）反应条件　核酸和正常或 SLE 血清间的非专一反应只在低 pH 区域发生，而不在 ≥ pH7.4 区域发生，而 SLE 血清和 DNA 的反应是在 pH 7.4 发生；

5）剂量反应曲线特性　对于非专一反应，在 DNA 过量时，不存在抑制沉淀形成现象，而在 SLE 血清和 DNA 反应系统，则表现出典型的抗体抗原反应的剂量曲线的特点，即存在明显的抗体过剩抑制区、平衡区和抗原过剩抑制区（参看第十一章，289页）；

6）从免疫复合物中分离出抗体　最后也是最重要的证据是能从 SLE 血清和 DNA 形成的复合物中，分离出保持抗 DNA 抗体活力的γ-球蛋白，并经抗-γ-球蛋白抗体鉴定为免疫球蛋白。后来，还进一步证明 DNA 是和免疫球蛋白的 Fab，而不是和 Fc-片段起反应的（Pincus 和 Kaplan，1970）。

所以，SLE 血清中确实存在真正的抗 DNA 抗体，并且 DNA 和 SLE 血清的反应是专一的免疫学反应。

（二）SLE 血清中抗 DNA 抗体的多样性

SLE 血清中的抗体是非常复杂的，除去存在抗天然 DNA 和变性 DNA 抗体外，还可能存在单链和双链 RNA 以及核蛋白的抗体。多数 SLE 血清主要和变性 DNA，或同时和天然 DNA 起反应。极少数 SLE 血清主要和天然 DNA起反应（图 3-4）。

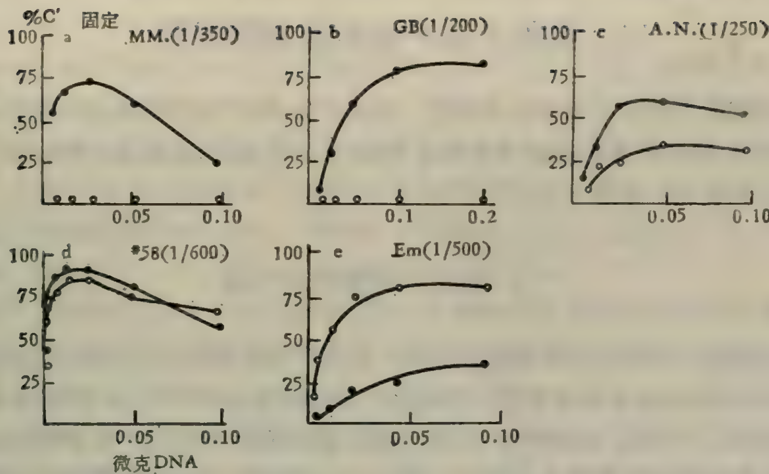


图 3-4　SLE 血清与天然的(○)和变性的(●)小牛胸腺 DNA 之补体固定反应(据 Levine 和 Stollar, 1968)。

(三) DNA 抗原决定簇的大小

利用长度不同的寡聚核苷酸，对 SLE 抗体和 DNA 反应系统的抑制实验证明 5 聚胸腺嘧啶核苷酸能产生最大的抑制(图 3-5)。因此，DNA 抗原决定簇的大小约相当于 4—5 核苷酸单位。这和其他几类抗原决定簇的大小是相近的(表 3-1)。

表 3-1　几种抗原结合位点(决定簇)的估测大小

抗　原	结合部位的组成	大小(Å)	根　据　文　献
半 抗 原	一个简单有机分子	5—15	Pressman 和 Grossberg (1968)
蛋 白 质	6—12 个氨基酸残基	25—45	Cebra (1961); Kabat (1966) Goodman (1969)
合成多肽	4—9 个氨基酸残基	20—35	Sela (1970)
多　　糖	6 单糖残基	35	Kabat (1966)
核　　酸	4—5 嘌呤或嘧啶残基	15—20	Stollar 等 (1962)

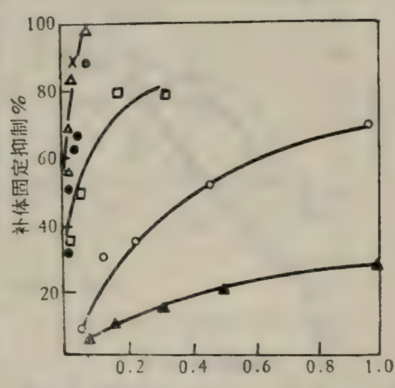


图 3-5　SLE 血清 (mm.) 和 B. natto 变性 DNA 反应系统中，增加单核苷酸(——)，2 聚核苷酸(▲)，3 聚核苷酸(○)，4 聚核苷酸(□)，5 聚核苷酸(△)，6 聚核苷酸(●)，7 聚核苷酸(×)时，补体固定反应的抑制(据 Stollar 等, 1962)。

决定簇的排列顺序可能全为嘌呤或全为嘧啶，或同时含有两类碱基 (Stollar 等, 1962; Stollar 和 Levine, 1963)。

二、实验方法产生的抗核酸抗体

这方面的研究主要是分两方面进行的：1）利用纯化的天然 DNA 或 RNA 大分子作免疫原；2）利用单核苷、单核苷酸或低聚核苷酸（作半抗原）和载体蛋白质（或人工合成多肽）结合，作为免疫原。现分述如下：

（一）高分子量核酸的免疫

由于前面提到过的困难，用提取的 DNA 大分子作免疫原，在动物上诱导抗体的早期工作进行得不顺利，结果也很紊乱。提纯的天然的或变性的 DNA，提纯的 RNA 单独都不能引起抗体。可是，破碎的 T-偶数大肠杆菌噬菌体（含有 50% DNA 和蛋白质），或核糖核蛋白体却表现很强的免疫原性。因此，这似乎提示核酸需要和蛋白质络合后才能引起抗体。由于这种启发，有人用带正电荷的甲基化牛血清白蛋白（简称 MBSA）与单链 DNA 络合作为免疫原，结果能在动物上引起很强的抗 DNA 抗体（Plescia 等，1964，1965）。人工合成的多核苷酸和 MBSA 络合也有免疫原性（Seaman 等，1965）。实验方法上的这种改进，打破了核酸抗原性研究初期的困难局面，从而有可能比较深入地研究抗体专一性问题。

1. DNA 抗体的血清学专一性

T-偶数大肠杆菌噬菌体 DNA，含有独特的碱基——葡萄糖基羟甲基胞嘧啶（Glycosyl dHMP），免疫家兔时得到的抗 DNA 抗体具有高度的物种专一性。根据对动植物和微生物中提取的 38 个 DNA 样品研究的结果，只有 T_2，T_4、T_6 大肠杆菌噬菌体的DNA 才能与抗 T_4-DNA 抗血清起反应（Murakami 等，1962）。半抗原抑制实验也证明糖或 dHMP 是 T-偶数大肠杆菌噬菌体 DNA 抗原决定簇的组成成分。

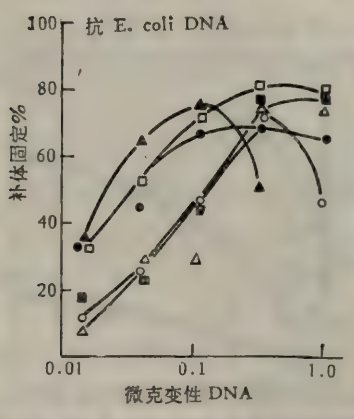


图 3-6 抗 *E. coli* DNA 抗体和几种变性 DNA 之补体固定反应。DNA 的种类：（●）*E. coli* （○）λb⁺；（▲）λb_2b_5 （△）*B. subtilis*；（■）*Haemophilus influenzae*；（□）*Pseudomonas aeruginosa*；（据 Levine 和 Stollar，1968）。

没有特异碱基的 DNA 产生的抗体的专一性就很低了。如大肠杆菌（*Escherichia coli*）DNA 和 MBSA 络合物免疫家兔得到的抗血清和许多种 DNA 发生广泛的交叉反应（图 3-6）。用小牛胸腺 DNA 加 MBSA，产生的抗血清也是这样（Plescia 等，1964）。

2. 抗 RNA 抗体的血清学专一性

和 RNA 反应的抗血清可以用多种方法制备。从细菌或哺乳类细胞分离的核糖核蛋白体（Barbu 和 Panijel，1960；Lacour 等，1962），tRNA 和 MBSA 的络合物（Plescia 等，1965）以及和蛋白质或合成多肽的共价结合物（Bonavida 等，1970）作为免疫原都能有效地诱导出能和 RNA 反应的抗体。单

用 tRNA（无蛋白质载体）免疫时产生的抗体只能和 tRNA 的酶解断片段反应，而不能和完整的分子反应（Herandez等，1968）。

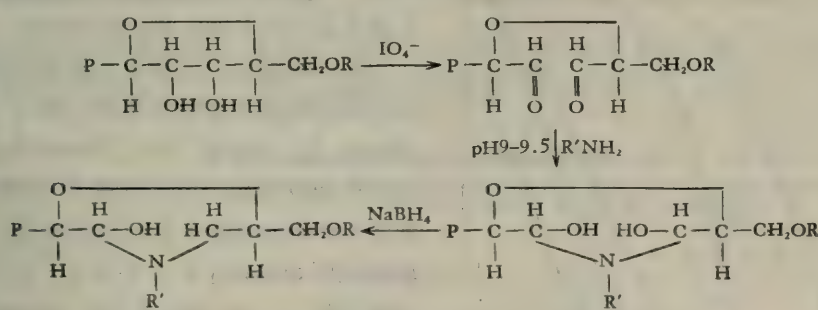
各种来源的核糖核蛋白体产生的抗体的专一性都很低，不但能和多种来源的 RNA 反应，而且还能与合成的多核苷酸（PolyA，PolyU，PolyC）起沉淀反应。如用细菌核糖核蛋白体免疫家兔得到的抗 RNA 抗血清，也表现出广泛的专一性，能和腹水瘤细胞、小鼠肝、人淋巴球、大肠杆菌以及酵母等的 RNA 起反应（Lacour 等，1962）。核糖核蛋白体的马抗血清能和 mRNA，rRNA，和 tRNA 反应，也能沉淀 PolyA，PolyU（Nahon 等，1965）。

有人进一步研究了抗 P. vulgaris 的 70 S 核糖核蛋白的马抗体的血清学专一性（Panijel 等，1966）。用 PolyA 沉淀后，分离纯化得到的抗 RNA 抗体，在无电解质或低离子强度溶液内的沉淀反应实验证明，这种抗 RNA 抗体的专一性主要是针对磷酸二酯骨架，而没有或很少有对碱基的专一性。因此，当改变多核苷酸而改变骨架的构象时，大分子的血清学专一性也会发生改变。另一方面，多聚核糖核苷酸的抗体则不同，其专一性主要是针对碱基而不是磷酸二酯骨架，并能和 DNA 交叉反应。

（二）含核酸组成成分或寡聚核苷酸结合物的免疫

1. 碱基专一抗体的制备

单核苷、单核苷酸或寡聚核苷酸作半抗原能和载体蛋白质（或多肽）形成共价结合物。通常连接方法如下图所示（Erlanger 和 Beiser，1964）：



稳定　　　　酸内不稳定

其中，P＝嘌呤或嘧啶

$R = H$ 或 $-P(=O)(OH)_2$

R'＝蛋白链（赖氨酸之 ε-氨基）

用这样的方法合成的嘌呤或嘧啶蛋白质结合物免疫动物时能产生碱基专一的抗体，并能和多种变性 DNA 反应。

核苷酸多肽结合物还可以用碳化二亚胺法将一定的核苷-5′-羧酸连结到人工合成的叉链多聚氨基酸上得到。这些结合物免疫家兔可得到抗尿嘧啶核苷酸，抗脱氧尿嘧啶核苷酸，抗胸腺嘧啶核苷酸，抗胞嘧啶核苷酸和抗腺嘌呤核苷酸的抗体（Sela 等，1964；Unger-Waron 等，1967）。同样地，还可以把寡聚核苷酸和 HSA，BGG，以及多聚赖

氨酸连接。这些结合物产生的抗体，专一性针对相应的半抗原，其中一些抗体还能和DNA发生广泛的交叉反应。

2. 碱基顺序专一性抗体

以二聚或寡聚核苷酸作半抗原能不能产生具有碱基顺序专一性的抗体呢？这是一个在核酸结构和功能研究上可能有重要的应用潜力，而又难于解决的问题。早期对一系列二核苷酸-蛋白质结合物（ApC-，ApA-，CpA-，ApU 和 UpA-蛋白质）研究的结果，发现抗体专一性主要是针对内侧(即和蛋白质相连的)碱基，如抗 CpA-蛋白质抗体能和 PolyA 反应，而抗 ApC-蛋白质抗体则不能和 PolyA 反应（Beiser 和 Erlanger，1966）。后来对嘌呤-嘌呤二核苷酸的研究也得到类似的结果，抗体对这两个碱基都能识别，不过专一性主要是由内侧碱基决定的（Wallace 等，1971；Bonavida，1972b）。此外，两种三核苷酸蛋白结合物（ApApU-BSA 和 ApApC-BSA），抗体专一性也主要是由内侧碱基决定的。这些抗三核苷酸抗体和变性 DNA 无交叉反应（Bonavida 等，1972b）。对另一系统，即碱基通过光氧化鸟嘌呤残基和蛋白质结合，如蛋白质-G(氧化)pA-3′-OH，抗体的专一性则是针对末端游离的核苷酸之-3′-OH 面的构造。这种抗体也不能和变性 DNA 反应(Van Vunaki 等，1968)。近来，用不同的方法对几种三联密码的抗体的碱基顺序专一性的分析，证明抗 ApApA 抗体只和原来的半抗原（ApApA）专一地反应，而一点也不和 A，ApA 结合。这种高度的专一性可能反映了抗体是和 ApApA 独特的空间构象互补。利用放射免疫法也证明抗 ApUpG 抗体对 ApUpG 顺序有高度专一性。在用沉淀反应分析时，抗 ApApC-和抗 ApUpG 抗体，虽能识别整个三核苷酸顺序，但也能和紧邻载体蛋白的碱基成分起交叉反应（D′Alisa 和 Erlanger，1974）。

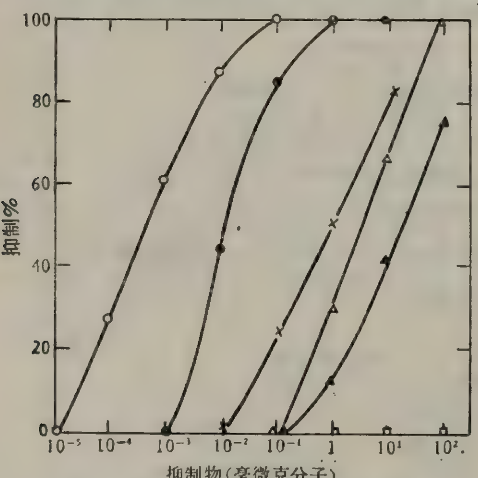


图 3-7 各种非放射性脱氧寡聚核苷酸对 ^{3}H-dpApTpA-抗 dpApTpA 结合的抑制。

(—○—) dpApTpA；(—●—) dpApApTpA；
(—×—) dpApApT；(—△—) dpApT；
(—▲—)；dpTpA；(—□—) dApT。

另一实验室的工作也证实抗双核苷酸和抗三核苷酸的抗体具有高度的顺序专一性（Khan 和 Jacob，1977；Khan 等，1977)。用各种非放射性的单核苷酸和寡核苷酸来抑制 ^{3}H-dpApTpA 和抗体的结合，结果发现半抗原 dpApTpA 本身对这一反应系统的抑制最强。抗体对四核苷酸 dpApApTpA（其构造中包含有 dpApTpA 顺序）的亲合力有所减弱，这可能是由于添加的一个单核苷酸造成空间障碍或其他变化所致。抗体对 dpApApT，dpApT 和 dpTpA 的反应非常弱，而去磷酸的二核苷酸 dApT 则不起反应(图 3-7)。表 3-2 总结了各种单核苷酸和寡聚核苷酸对 ^{3}H-dpApTpA-抗体和 ^{3}H-dpApApT-抗体系统的抑制作用。参与这两个三核苷酸组成的 dpT、dpA、dpApT 和 dpTpA 对抗体的亲合力很低，表明抗体专一性可能是和整个三核苷酸分子互补。寡聚核苷酸 dpTpT、dpTpC、dpApG、dpTpTpT 对 ^{3}H-dpApTpA 和抗体的抑制作用很

表 3-2　各种单核苷酸和寡聚核苷酸对 ^{3}H-dpApTpA-抗体和 ^{3}H-dpApApT-抗体系统的抑制

No.	抑　制　物	50% 抑制所需的浓度 (*M*)	
		抗-dpApTpA 抗 体	抗-dpApApT 抗 体
1	dpApTpA	2.0×10^{-9}	2.50×10^{-5}
2	dpApApT	3.33×10^{-6}	2.70×10^{-7}
3	dpApApTpA	3.70×10^{-8}	3.33×10^{-6}
4	dpTpTpT	3.33×10^{-6}	2.80×10^{-5}
5	dpApT	1.80×10^{-5}	1.50×10^{-5}
6	dpTpA	6.70×10^{-5}	3.33×10^{-4} c
7	dpApG	3.70×10^{-5}	3.33×10^{-4} d
8	dpTpT	4.0×10^{-5}	3.33×10^{-4} e
9	dpTpC	3.33×10^{-5}*	3.33×10^{-4} f
10	dApT	—	3.33×10^{-4} g
11	dpA	2.70×10^{-4}	3.33×10^{-3} h
12	dpT	2.30×10^{-3}	3.33×10^{-3} i
13	dpG	3.33×10^{-3} b	3.33×10^{-3} j

* 此浓度时 20% 抑制　b. 18% 抑制　c. 26% 抑制　d. 25% 抑制　e. 48% 抑制　f. 2% 抑制　g. 6% 抑制　h. 28% 抑制　i. 15% 抑制　j. 8% 抑制。
（据 Khan 和 Jacob，1977）。

弱。这些材料清楚地证明此三核苷酸抗体有高度的顺序专一性。另一方面，抗dpApTpA 抗体和变性的小牛胸腺 DNA 有交叉反应。这可能是由于 DNA 中存在 dpApTpA 顺序。

3. 核酸抗原专一性的特点

从上述几节材料可见，用实验方法产生的抗核酸抗体是不均一的，并和各种来源的核酸表现广泛的交叉反应。各种抗核酸及其结构成分的抗体的专一性列于下表：

表 3-3　用各种实验方法产生的核酸抗体的专一性

免　疫　原	测 试 抗 原 (c′ 固 定，沉 淀 反 应)				
	单核苷酸	寡聚核苷酸	多 聚 核 苷 酸		
			人 工 合 成	RNA	DNA
变性小牛胸腺 DNA + MBSA	−	−	+	+	+
变性 T_4 噬菌体 DNA + MBSA	−	−	−	−	+[a]
S-RNA + MBSA	−	−	+	+	+
合成 dAT 共聚物 + MBSA	−	−	+	+	+
合成均聚物 + MBSA	−	−	+[b]	+	+
寡聚脱氧核糖核酸 + MBSA	−	?			+
寡聚核糖核酸 + MBSA	−	+		+	+
单核苷 + BSA	−	−		−	+
嘌呤 + BSA	−	−		+	+
嘧啶 + BSA	−	−			+
核糖核蛋白体	−	−	+	+	−

a. 只和含葡萄糖基碱基反应　b. 只和同型均聚物反应。
（据 Plescia 和 Braun，1967）。

总结以上各方面材料可见，就核酸大分子上一定的决定簇和抗体的反应而论，同样存在着和蛋白质、多糖以及其他人工合成的决定簇相似的抗原专一性。然而，当比较不同物种来源的核酸的血清学反应时，就表现出和蛋白质、多糖抗原有非常明显的区别了。和蛋白质、多糖显然不同，核酸抗体很少有种属专一性。除去有独特碱基的核酸，如T偶数噬菌体(含 glycosyl dHMP) 外，核酸抗体的种属专一性很低，能和不同来源的碱基组成和排列非常不同的核酸发生广泛的交叉反应。虽然能否用实验方法得到某一核酸的均一的专一抗体还是未解决的问题，不过仍可以从蛋白质和核酸大分子结构上的区别，作一些理论上的推测。

蛋白质抗原抗体系统具有高度的种属专一性。这应归因于多肽链是由20种氨基酸按特定的顺序排列，不同的排列顺序决定不同的空间构象。不同物种的同源蛋白质(如溶菌酶、细胞色素C)的排列顺序不同，因而其抗原专一性也就不同。至于核酸，多核苷酸链的排列只包括四种碱基的变化(虽然存在某些稀有碱基，往往也不是某一物种的核酸所独有)。如前述，核酸抗原决定簇的大小只包含5—6核苷酸单位。若按"三联体"遗传密码计算，一个抗体结合位点，至多只能识别2个密码。因此，对于DNA大分子上某一个决定簇(如某2个三聚核苷酸顺序)专一的抗体，就有可能和任一排列顺序中含有此2个密码的核酸起反应。由于DNA大分子含有3,000—600,000核苷酸单位，含有这2个密码的机率是相当高的。因此，核酸抗体的专一性不能不是很广泛的，能和许多来源和结构极不相同的核酸起交叉反应。只有假定相当长的一段排列顺序(为某一基因专一的)构成一个决定簇时，才有可能产生对特定的一个核酸分子专一的抗体，而这又是和抗体结合位点的大小实际上不相容的。

由于核酸一级结构的特殊性，抗核酸抗体通过碱基排列顺序来识别核酸大分子受到很大的限制，但是抗核酸抗体的专一性对核酸大分子的空间构象(特别是二级结构)，却表现出明显的依赖关系。已知 tRNA 具有三叶草形状的固定的空间构象(见图3-3)。最近在 NZB/NZW 杂种小鼠血清中发现抗天然 tRNA 的抗体，它能专一地识别天然 tRNA 和变性的 tRNA，但不能区分这种天然 tRNA 是来源于大鼠，还是大肠杆菌(Eilat 等，1976)。换句话说，抗核酸抗体虽难于区分核酸分子结构的"细节"，却能识别分子的大致"轮廓"。

三、核酸抗原性和空间构象的关系

和蛋白质抗原相比较，核酸分子可能不存在相当于多肽那样严格的"顺序"决定簇，但是存在着相当于多肽的"构象"决定簇，特别是依赖二级结构的"螺旋"构象决定簇。这从变性和复性过程中，DNA 抗原性的变化，以及近来对人工合成的单链、双链和三链多聚核苷酸抗原性的研究得到阐明。

(一) DNA 变性和分子量对抗原性的影响

由于前面提过的分子结构特点，天然 DNA 分子中，碱基朝向双螺旋的中央，埋于槽内，因而不能提供有效的碱基顺序决定簇，而只能提供包含一条或两条磷酸二酯骨架的

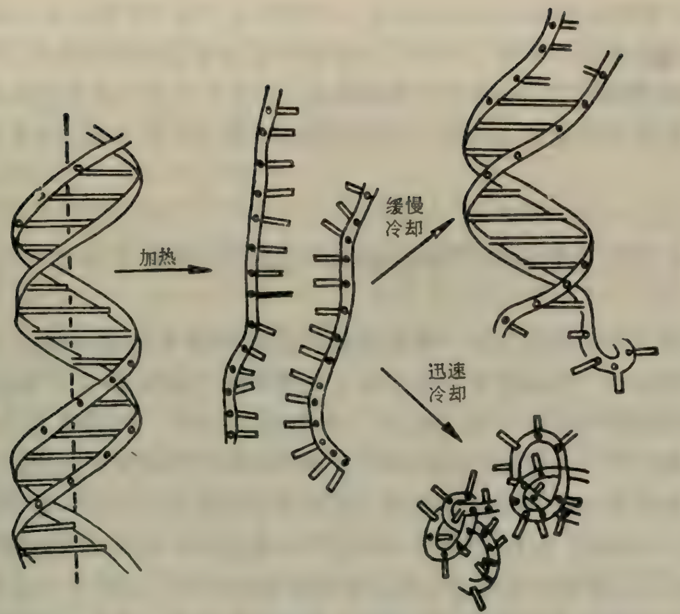


图 3-8 示可能提供几种不同的抗原决定簇的 DNA 分子形式。天然的双螺旋的多核苷酸(左),代表包括一条链或两条链骨架的决定簇。加热时,两条链拆开,保持相当的伸展状态(中)。低浓度迅速冷却时,多核苷酸链卷曲成线团状变性形式,碱基外露易起反应(右下)。相当匀一的样品,缓慢冷却时,产生有部分螺旋的复性的分子(右上),同时提供碱基顺序决定簇和螺旋构象决定簇(据 Stollar, 1973)。

"构象"决定簇。加热时,双螺旋拆开,结果每一条单链保持相当伸展的状态。这时若迅速冷却,单链便会卷曲呈线团状,碱基外露。变性的单链 DNA 的抗原性因而大大提高(图 3-8)。一般说来,变性的单链 DNA 是分子的免疫活性形式。通常用实验方法产生的抗 DNA 抗血清,主要是和变性的单链 DNA 起反应(图 3-9)。DNA 加热后缓慢冷却时,能恢复部分的螺旋结构。复性的 DNA 分子,用 3′ 端专一的磷酸二酯酶处理时,便失去部分活性。这提示复性分子末端有单链区域存在,也就是说可能同时存在"螺旋"构象决定簇和碱基顺序决定簇(图 3-8)。

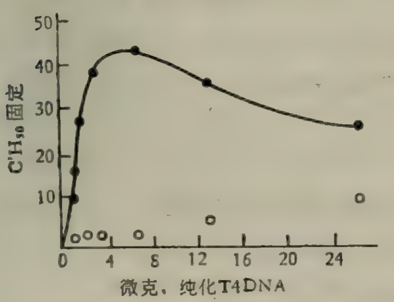


图 3-9 天然和热变性 T4 DNA 的补体固定。
(--●--) 热变性 DNA (100℃,10 分钟);
(--○--) 天然 DNA。

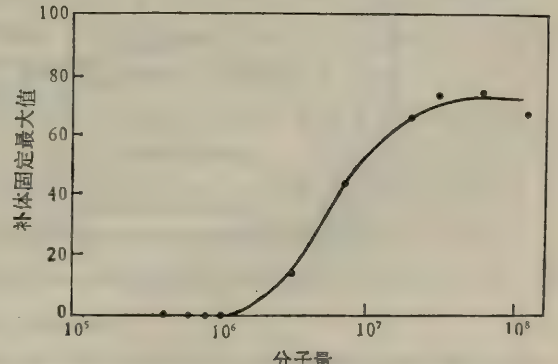


图 3-10 T4 DNA 之抗原活性为平均分子量的函数。

DNA 分子量的大小和抗原活性也有一定的关系。将 T4 噬菌体 DNA 经超声波破碎成大小不等的碎片。分子量 $>2\times10^7$ 的片段，免疫学活性和原来的 DNA 分子相同，没有改变。在此范围以下，随着分子量的降低，片段的免疫学活性也降低(图 3-10)。不过，那些失去免疫学活性的小片段，仍具有抑制单链 DNA 和抗 DNA 抗体间的反应的能力。

（二）人工合成多核苷酸的二级结构和免疫学专一性

近年来利用人工合成的双链、单链多核苷酸和 MBSA 的复合物诱导的抗血清进行的研究，清楚地证明了抗体的专一性依赖于免疫原的二级结构——“螺旋”构象。

用合成的双链多核苷酸，如 PolyA · PolyU，PolyI · PolyC 以及 PolyG·PolyC 与 MBSA 的复合物，免疫家兔时都能产生专一性针对双螺旋构造的抗体，能沉淀同型的或异型的双链多核苷酸，并能与同型单链均聚核苷酸反应，而不能与异型均聚核苷酸反应（Lacour，1968）。如抗 PolyI · PolyC 的抗血清，除和同型抗原（PolyI · Poly C）发生反应外，还能和几种异型双链多核苷酸发生程度不等的交叉反应，其中以Poly A · PolyU 反应最强，PolyrG · PolyrC 最弱。后者甚至比含有相同碱基的双链多聚脱氧核苷酸 PolydG · PolydC 还要弱(图 3-11)（Nahon-Merlin 等，1973）。抗 PolyI · PolyC 抗血清还能和天然 RNA 反应。比较双链多核苷酸和单链均聚多核苷酸对此反应系统的抑制能力，以及用多核苷酸、Reovirus RNA 的吸附实验，都表明抗体是和 RNA 分子的双链区域起反应的。此外，还观察到抗 PolyI · PolyC 抗血清和 rRNA 的反应程度比和 tRNA 的反应程度高。除去 tRNA 的空间构象（图 3-3）可能造成某种空间障碍外，还可能是由于 rRNA 比 tRNA 含有更多的螺旋构象决定簇，因为有证据提示 rRNA可能含有更多碱基配对区域。顺便要提及，由于这种类型的抗血清具有针对双螺旋构象的专一性，因此可以用来测定 Arbovirus 感染的哺乳类细胞中，小量的双链 RNA 的存在（Stollar 和 Stollar，1970），还可能用于研究各类天然 RNA 的构象(分子中双螺旋结构的含量)。

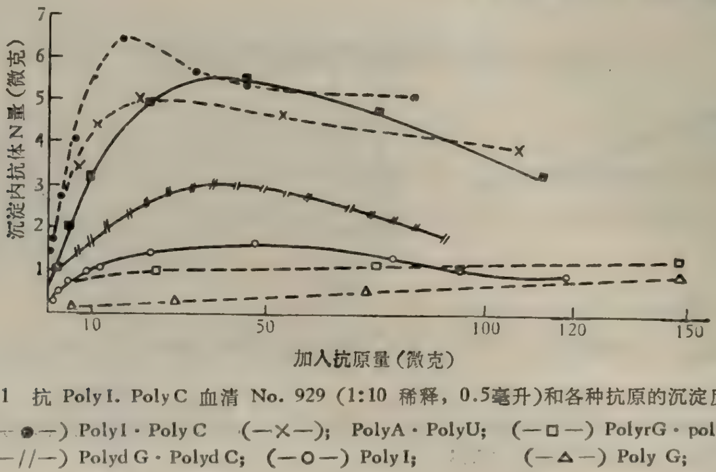


图 3-11 抗 PolyI. PolyC 血清 No. 929 (1:10 稀释，0.5毫升)和各种抗原的沉淀反应。
(—●—) PolyI · Poly C (—×—); PolyA · PolyU; (—□—) PolyrG · polyrc;
(—//—) Polyd G · Polyd C; (—○—) Poly I; (—△—) Poly G;
(—■—)小鼠腹水瘤细胞总 RNA（据 Nahon-Merlin 等,1973)。

更有趣的是，抗三链多核苷酸（PolyA2·PolyU）的抗血清只能和三链抗原起反应，而不能和同型单链、双链多核苷酸起反应，虽然后二者都是前者组成的一部分。以上这些事实都有力地提示，核酸抗原大分子螺旋的空间构象特性（包括螺距、碱基方位、碱基对相对于螺轴的倾角，以及大槽、小槽的相对大小等），特别是戊糖磷酸二酯链的外表几何形状对免疫学专一性起重要的作用。

利用这一类抗体还能发现天然 DNA 和天然双链 RNA 构象上的区别。抗双链多核苷酸（PolyA·PolyU）的兔抗体能和合成的或天然的双链 RNA 发生免疫反应，但不能和天然的双链 DNA 分子反应。反之，SLE 血清中存在的抗天然 DNA 抗体却不能和双链 RNA 反应。以上这两类抗体各自和 RNA-DNA 杂交分子都能发生程度不同（1%—50%）的交叉反应。可是，用这种杂交分子诱导出来的抗体，则既不能和双链 RNA 起反应，又不能和天然 DNA 起反应。此外，抗 Poly dG·Poly dC 抗体也不能和天然 DNA 分子反应。物理学测量（如旋光色散、圆二色性等）证明双链 DNA 和双链 RNA 的构象存在多方面的差别（Young 和 Samejima，1969）。这种构象上的不同可能是它们相互缺少免疫化学上的交叉反应的原因。RNA-DNA 杂交分子的构象和天然 DNA、RNA 分子，也都有不同。这也许可以解释为什么它和双链 RNA 或双链 DNA 的抗血清只有低的交叉反应，特别是杂交分子本身的抗血清具有高度的专一性。同样地，PolydG·PolydC 虽然和 DNA 一样，能和 SLE 血清反应，可是它的 X 射线衍射图样和 DNA 仍有所不同。抗 Poly dG·Poly dC 的抗血清竟能将它和天然 DND 构象上细致的差别区分出来。很有趣的是，抗 Poly dG·Poly dC 的抗血清甚至不能和 *Pseudomonas fluorescens* 的 DNA 起免疫化学反应，虽然在这种 DNA 中，dG·dC 碱基对的含量高达 72%。这说明单是 dG·dC 碱基对高含量这种碱基组成上的特点，并不能使这种分子得到同 Poly dG·Poly dC 相似的免疫学专一性，更为重要得多的是分子的构象。以上这些事实，更加证实了上述的假定，即这类抗核酸抗体的免疫学专一性依赖螺旋构象的空间特点，而不是其碱基组成或戊糖的性质（Stollar，1970，1973；Stollar 和 Raso，1974）。

总结起来，核酸的抗原专一性有如下特点：

1）除具有独一无二的碱基的少数几种核酸之外，抗核酸抗体通过碱基顺序来识别核酸大分子是有很大限制性的。也就是说没有相当于多肽链那样严格的“顺序”决定簇；

2）另一类依赖核酸构象的抗体，却能相当严格地区分单链、双链、三链以及杂交核酸分子的空间构象。也就是说存在相当于蛋白质的“构象”决定簇；

最后，还要谈一下核酸的免疫原性的问题。用实验方法易于引起变性 DNA（单链）的抗体，但迄今还不能引起抗天然 DNA 的抗体。天然 DNA 的抗体仅发现存在于SLE 病人或 NZB/NZW 杂种小鼠血清中。合成的双链多核苷酸只有在构象和天然 DNA 有明显差别时，才能在家兔引起抗体。同时这些抗体都不能和天然 DNA 起免疫反应。Poly dAT·Poly dAT 分子构象和天然 DNA 很相似，就不能在家兔引起抗体。另一方面，天然双链 RNA 却易于引起抗体。

从上述这些事实看来，家兔似乎对天然 DNA 分子构象有耐受性，而对天然 RNA 分子构象则无耐受性。这可能是由于在正常情形下，天然的双链 DNA 和单链 RNA 在每一个细胞内都普遍存在，机体显然对它们有耐受性；而新的构象（去螺旋化的单链

DNA，双链 RNA）作为外源抗原就易于被机体的免疫机制识别。只有当机体的正常免疫自稳机制破坏时，如 SLE 病人，才会产生抗天然 DNA 的抗体。

四、抗核酸抗体的应用

随着对抗核酸抗体及其专一性的认识逐步深人，利用这些抗体作为分析工具，来研究核酸的结构和功能的工作也开始增多。现将一些主要方面例举如下：

（一）对核酸组成成分专一的抗体

一些特殊碱基或核苷酸具有重要的生理或药理作用。如 5-溴尿嘧啶、5-碘尿嘧啶等常用于诱变或抗肿瘤。它们和 BSA 的结合物产生的抗体，可用来测定它们参人 DNA 分子的情况（Sawicki 等，1971）。目前受到重视的环核苷酸（cAMP，cGMP）是激素作用于细胞的第二信使分子。应用它们的专一抗体，结合放射免疫法和萤光标记抗体法，可显示这两种分子在靶细胞内分布的动态变化，从而推测其功能（Fallen 等，1974）。再如一种特殊碱基 iA（N^6-异戊烯基腺苷）的专一抗体，能和酵母 $tRNA^{Tyr}$ 的位于反密码子突环上的 iA 残基起反应。因此，这一类抗体可能用来研究含 iA的tRNA 的生物学功能（Hacker 等，1972）。

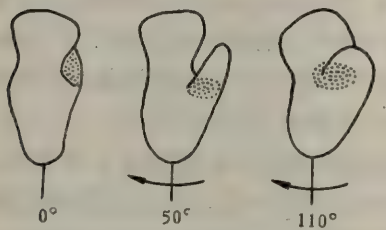


图 3-12 用专一抗体显示二甲基腺苷在大肠杆菌核糖体小亚基上的位置。黑点区域示二甲基腺苷分布位置(据 Politz 和 Glitz,1977)。

已知大肠杆菌核糖体 16S RNA 的 3′ 端 24 和 25 残基位置上存在相连的两个特殊碱基 N^6，N^6-二甲基腺苷，这是分子其他部位所没有的特殊标记。最近，有人用抗 N^6，N^6-二甲基腺苷的专一抗体处理分离的大肠杆菌核糖体小亚基，电子显微镜观察发现含此特殊碱基的 16 S RNA 的 3′ 端在小亚基上分布的区域正好和起始因子（IF-3）分布区域相同，这提示小亚基的上部是蛋白合成开始的地方（图 3-12）（Politz 和 Glitz,1977）。

抗体还可用来研究核苷酸分子的构象变化。如有人用兔抗 AMP-卵白蛋白抗体来研究 ADP，ATP 分子在水溶液中的构象，发现 ADP，ATP 在有 Mg^{++} 离子存在时，分子处于折叠构象，因而不能和抗 AMP 抗体反应；去除 Mg^{++}，分子又恢复伸展状态，又易于和该抗体结合（Estrada-Parra 和 Garcia-Ortigoza，1972）

（二）DNA 的变性和复性

单链的变性 DNA 分子比双链天然分子的抗原性大大加强。因此，可以用抗单链 DNA 抗体来测定 DNA 的变性，从双链结构到单链结构的转变过程。用免疫化学方法测得的 50% 变性温度（Tm）和用测量 260 毫微米增色性变化得到的 Tm 是一致的（Levine 和 Van Vunakis，1967）。利用这类抗体还可以检测天然双链分子内是否有局部的“单链”区域存在。

（三）辐射损伤

抗核酸抗体能检测天然 DNA 分子中单链区域的专一性，其另一重要用途是研究 DNA 的辐射损伤问题。

1. 次甲基蓝的光氧化作用

在存在 O_2 和光敏染料——次甲基蓝的条件下，DNA 受到可见光照射能引起鸟苷残基专一的损伤，称为光氧化作用。用免疫化学方法测出，随光氧化时间延长，T4-DNA 的免疫学活性（补体固定）也增高，提示分子局部破坏，单链结构增加。长期照射后的 T4-DNA，再加热变性时，就会失去固定补体的能力，但仍保持抑制 T4-DNA-抗 T4-DNA 系统反应的能力。这说明长期照射可能导致天然大分子骨架上的多点破坏，变性结果产生的片段分子量过小（Levine 等，1968）。

2. U. V. 损伤与修复

大剂量紫外辐射能使 DNA 中相邻的嘧啶核苷酸之间形成化学键（产生嘧啶二聚物），阻碍 DNA 聚合酶的作用，而造成细胞的辐射损伤。这种被损伤的细胞，如暴露在强烈的可见光源下，有很大比例的损伤细胞又可能恢复，这一现象称为光致复活作用。

当用经 U. V. 辐射损伤的 DNA 免疫时，能产生对这种损伤 DNA 专一的抗体，并证明其专一性是针对胸腺嘧啶二聚物的。利用萤光标记的这种专一抗体可以显示染色体上 DNA 的损伤部位。对于经 U. V. 辐射（300 尔格/毫米^2）的离体培养的羊膜细胞，可以追踪核内二聚物在 4 小时内消失。这和用其他生化方法推测的修复时间（5 小时）是相近的（Lucas，1972）。

经大剂量 U. V. 照射（10^5尔格/毫米^2）的 DNA 能引起和损伤构造起反应的抗体，而小剂量照射（2×10^4尔格/毫米^2）则不能产生抗体。假定这可能是由于小剂量照射时，二级结构的改变不大。小剂量照射过的 DNA，经加热变性后再用来免疫动物，就可以产生能和 U. V. 损伤的 DNA 起反应的抗体（Poverenny 等，1973）。

（四）染色体结构

染色体结构是目前生物学中尚未解决的重要问题。Crick（1971）提出染色体结构模型，假定一条染色单体是由球状控制 DNA 和纤维状密码 DNA 相间排列构成的。这一假说的要点是球状控制区存在由碱基不配对的单链 DNA 构成的“辨认位点”，能和辨认蛋白或 cRNA 相互作用，从而使基因激活。因此，这一假说也称为不配对假说。染色体结构中有无局部的单链构象存在，是这一假说能否成立的关键。Levy 和 Simpson（1973）用对单链构象专一抗血清作补体结合抑制实验，测定出染色质 DNA 中只有大约 0.01% 是单链的。作者认为这一事实不支持 Crick 模型。

哺乳类动物和人染色体，经 Giemsa 法染色或奎吖因（Quinacrine）萤光染料染色时，均呈现出每条染色体特异的区带图案。利用免疫化学方法可证明这种横纹是有其

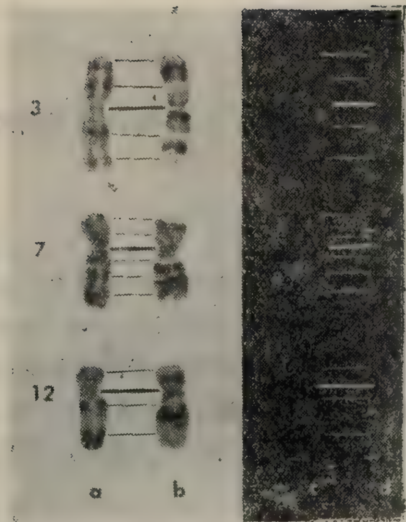


图 3-13 人第 3,7 和 12 号染色体，示用下列技术得到的染色区带间的对应关系：
(a) Giemsa R-带；(b) Giemsa G-带；(c) 抗—A带；(d) 抗—C带。粗线：中粒；细线：(a) 和 (d) 行染色体上染色深的带；(b) 和 (c) 行染色浅的带的对应关系。注意 Giemsa R-带和抗—C带间，Giemsa G-带和抗—A带之间的对应关系(据 Schreck 等,1973)。

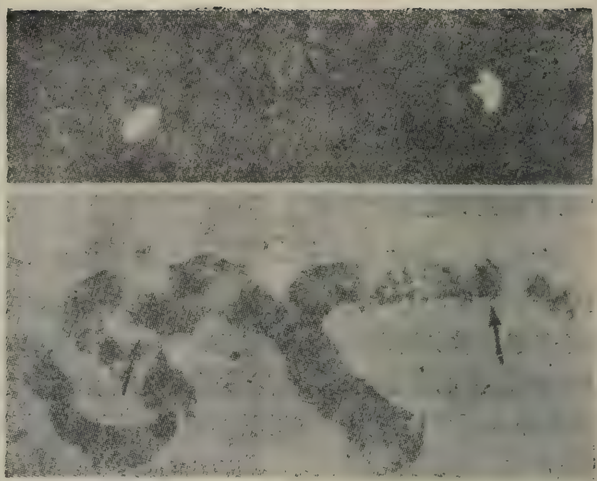


图 3-14 利用间接免疫萤光法检测原位形成的 RNA-DNA 杂交分子，以显示果蝇多线染色体之 5S rRNA 基因。两条同型 2R 染色体，除去远端部分外，没有配对。5S rRNA 基因位于不配对部分，每一条同型染色体上至少可见两条萤光带(上)。箭头示同一染色体经醋酸地衣红染色后的 5SrRNA 基因区域(下)（据 Rudkin和 Stollar, 1977)。

分子基础的。如将染色体先经次甲基蓝光氧化破坏 DNA 鸟苷残基后，再用萤光标记的抗胞嘧啶专一抗体(抗-C)作间接法染色时，显示出和用 G带法 Giemsa 染色或奎吖因萤光染料染色时相反的区带图案。若用甲酰胺变性后，再用萤光标记抗腺嘌呤专一抗体(抗-A)染色时，则显出同 G 带法 Giemsa 染色或奎吖因萤光染色相同的图案(图 3-13)。这提示染色体区带图案可能反映染色质 DNA 纵向排列上，碱基组成的有规则的差别 (Shreck 等，1973；Dev 等，1972)。此外，利用萤光标记抗单链 DNA 的专一抗体，还证明染色体着丝点(异染色质区域)存在着高度重复顺序结构 (Mace 等，1972)。最近，还有人利用萤光标记的抗 DNA-RNA 杂交分子的构象专一抗体，能显示果蝇多线染色体上以杂交分子形式存在的 RNA (图 3-14)。由于染色位置在幼虫期和预蛹期发育中发生变化，这提示此种 RNA 分子可能参与转录和（或）复制的控制 (Rudkin 和 Stollar, 1977)。最近，这方面最重要的进展是用专一的抗 Z-DNA 抗体在果蝇多线染色体上证实有左旋构象的DNA存在，从而提示DNA构象的转变可能对染色体上基因功能活动的调控有重要作用(参看补注1，第542页)。总之，这些例子说明免疫组织化学方法，特别是把核酸和蛋白质的细胞内定位方法结合起来使用，对于研究染色体的结构可能是很有用处的。

(五) 抗核酸抗体的生物学效应

抗 DNA 抗体曾用于分析细菌转变因子对细胞诱变的机制。也有人利用抗核酸碱基抗体来分析发育问题。Rosenkranz (1964) 用抗嘌呤、嘧啶的专一抗血清处理海胆卵，发现抗体能进入细胞，并专一地抑制发育，使发育停顿于一定的时期。还有人用嘌呤-人血清白蛋白结合物免疫动物，初步观察到移植肿瘤的生长受到抑制 (Sinai, 1965)。

后来，还发现抗胸腺嘧啶抗体和正常的免疫球蛋白都能进入癌变的中国田鼠肺细胞，但不能进入同样培养条件下的正常肺细胞。其次，抗胸腺嘧啶抗体能抑制癌细胞的生长，而正常的免疫球蛋白则无此作用（Liebeskind 等，1971）。

总结起来，和其他大分子抗原一样，核酸也具有免疫原性和抗原专一性。目前，应用免疫学方法来研究核酸的结构和功能尚处于初期阶段，还大有发展前途。可以乐观地设想，随着有关核酸结构的知识的增多以及已知排列顺序的片段的分离和合成技术的进步，将来可能得到更专一的抗核酸抗体，用来分析核酸和染色体的结构，或专一地影响基因表现，从而为控制生长、发育和肿瘤，提供一个新的手段。

参　考　资　料

综述

Beiser, S. M. and Erlanger, B. F. (1966). Antibodies which react with nucleic acids. *Cancer Res* 26, 2012.

Levine, L. and Van Vunakis, H. (1967). Serologic activities of the nucleic acids. In: "Antibodies to Biologically Active Molecules," Cinader, B., ed., Vol. 1, p. 25.

Levine, L. and Stollar, B. D. (1968). Nucleic acid immune system. In: "Progr. in Allergy," v. 12. p. 161.

Plescia, O. J. and Braun, W. (1967). Nucleic acids as antigens. *Adv. Immunol.* 6, 231.

Plescia, O. J. and Braun, W., eds. (1968). Nucleic Acids in Immunology. Springer-Verlag, Berlin & New York.

Stollar, D. (1973). Nucleic acid antigens. In: "The Antigens," Vol. 1. p. 2-, ed. by M. Sela.

论文

Arna. R. and Seligmann. M. (1966). Presence, dans certains serums de lupus. d'anticorps anti-acide deoxyribonucleique natif. *C. R. Acad. Sci.* 262, 2665.

Arnott, S. and Bond, P. J. (1973). Structures of poly (U), poly (A) triple stranded polynucleotides *Nature New Biol.* 244, 99.

Barbu, E. and Panijel, J. (1960). Presence d'anticorps anti-acide ribonucleique dans les immunserums antiribosomes. *C. R. Acad. Sci.* (Paris) 250, 1382.

Barbu, E and Panijel, J. (1961). Concentration and properties of antiribonucleic acid (RNA) antibodies. *C. R. Acad. Sci.* (Paris) 252, 3157.

Bonavida B., Fuchs, S. and Sela. M. (1970). Antibodies to transfer RNA obtained with covalently linked tRNA conjugates. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 41, 1335.

Bonavida, B., Fuchs, S., Sela, M., Roddy, P. W. and Sober. H. A. (1972). Specific antibodies to dinucleotides and trinucleotides. *Eur. J. Biochem.* 31, 534.

Crick, F. (1971). General model for the chromosome of higher organisms. *Nature* 234, 25.

D'Alisa, R. M. and Erlanger, B. F. (1974) Antibodies to the codons ApApA. ApApC and ApUpG. *Biochemistry* 13, 3575.

Dev, V. G., Warburton, D. Miller, O. J., Miller, D A., Erlanger, B. F. and Beiser, S. M. (1972). Consistent pattern of binding of anti-adenosine antibodies to human metaphase chromosomes *Exp. Cell Res.* 74, 288.

Eilat, D., Schechter, A. N. and Steinberg, A. D. (1976) Antibodies to native tRNA in NZB/NZW mice *Nature* 259, 141.

Erlanger, B. F. and Beiser, S. M. (1964). Antibodies specific for ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) 52, 68.

Estrada-Parra, S. and Garcia-Ortigoz, E. (1972). Immunochemical determination of molecular conformation of nucleotides. *Immunochemistry* 9. 799.

Fallon. E. F., Agrawal, R. Furth. E. and Steiner, A. L. (1974). Cyclic guanosine and adenosine 3',5'-monophosphates in canine thyroid: localization by immunofluorescence. *Science* 184, 1089.

Hacker, B., Van Vunakis, H. and Levine, L. (1972). Formation of an antibody with serologic specficity

for N^6-(Δ^2-isopentenyl) adenosine. *J. Immunol.* **108**, 1726.

Hernandez, R., Burgin-Wolff, A. and Just, M. (1968). Antibodies to enzymatic breakdown products of yeast tRNA. *Eur. J. Biochem.* **6**, 23.

Khan, S. A., Humayun, M. Z. and Jacob, T. M. (1977) Antibodies specific to a deoxyribonucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* **4**, 2997.

Khan. S. A. and Jacob, T. M. (1977). Antibodies specific to two deoxyribonucleotide sequences. *Nucleic Acids Res*, **4**, 3007.

Lacour, F., et al. (1968). Specific antibodies to polynucleotide complexes and their reaction with nucleic acids: importance of secondary structure of the antigen. In: "Nucleic Acids in Immunology", p. 32.

Levine, L., (1962). Determinants of specificity of proteins, nucleic acids and polypeptides. *Feration Proc.* **21**, 711.

Levine. L., Seaman, E. and Van Vunakis, H. (1968). Immunological evidence for the identity of a photoproduct formed during photooxidation of DNA with methylene blue, rose bengal, thonin, and acridine orange. In "Nucleic Acids in Immunology" p. 165.

Levy, S. and Simpson, R. T. (1973). Quantitative immunochemical search for single stranded DNA in chromatin. *Nature New Biol.* **241**, 139.

Liebeskind, D. S. p., Hsu, K. C., Erlanger, B. F. and Beiser, S. M. (1971). Selective inhibition of transformed cells in culture by anti-thymidine antibodies. *Nature New Biol.* **234**, 127.

Lucas, C. J. (1972). Immunological demonstration of the disappearance of pyrimidine dimers from nuclei of cultured human cells. *Exp. Cell. Res.* **74**, 480.

Mace, M. L., et al. (1972). Differential immunofluorescent labeling of chromosomes with antisera specific for single strand DNA. *Exp. Cell. Res.* **75**, 521.

Miescher. P. and Strassle, R. (1957). New serological methods for the detection of the LE factor. *Vox Sang.* **2**, 283.

Murakami. W. T., Van Vunakis, H., Grossman. L. and Levine, L. (1961). Immunochemical studies of bacteriophage deoxyribonucleic acid. II. Characterization of the active antigen *Virology* **14**, 190.

Nahon, E., Lacour, F. and Harel, J. (1965). Identification immunoglobique de diverses fractions de RNA cellulaire et de polynucleotides de synthese. *C. R. Acad. Sci.* (Paris) **260**, 357.

Nahon-Merlin, E., Moulart, L. and Lacour, F. (1973). Immunochemical study of antipoly I. poly C antibodies and of their reaction with RNA. *Immunochemistry* **10**, 571.

Panijel, J., Souleil, C. and Cayeux, P. (1966). Immunochemical characteritation of polyribonucleotides. *Science* **152**, 773.

Pincus F. and Kaplan, A. P. (1970). True antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus; activity of Fab and $F(ab)_2$ fragments. *Nature* **227**, 394.

Plescia, O., Braun, W. and Palzuk, N. (1964). Production of antobodies to denatured deoxyribonucleic acid (DNA). *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **52**, 279.

Plescia, O., Palczuk, N., Cora-Figueroa, E., Mukherjee, A. and Braun, W. (1965). Production of antibodies to soluble RNA (sRNA). *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **54** 1281.

Politz, S. M. and Glitz, D. G. (1977). Ribosome structure: Localization of N^6, N^6-dimethyladenosine by electron microscopy of a ribosome antibody complex *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 1468.

Poverenny, A. M., Sayenko, A. S., Nasonova, V. A., and Kreier, V. A. (1966). Interactions of proteins (antibodies) with the deoxyribonucleic acid molecule. *Nature* 211, 1297.

Poverenny, A. M., Podgorodnicchenko, V. K. and Saprygin, D. B. (1973). The secondary structure of nucleic acids which induce the immunological response. *Immunochemistry* **10**, 577.

Robbins, W. C., Holman, H. R., Deicher, H. R. and Kunkel, H. G. (1957). Complement fixation with cell nuclei and DNA in lupus erythematosus. *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N. Y.) **96**, 575.

Rosenkranz, H. S., Erlanger, B. F., Tanenbaum, S. W. and Beiser, S. M. (1964) Purine and pyrimidine specific antibodies; effect on the fertilized sea urchin egg. *Science* **145**, 282.

Rudkin, G. T. and Stollar, B. D. (1977). High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by direct immunofluorescence *Nature* 265, 472.

Sawicki, D. L., Erlanger B. F. and Beiser, S. M. (1971). Immunochemical detection of minor bases in nucleic acids. *Science* **174**, 70.

Schreck, R. R., et al. (1973). Chromosome structure as revealed by a combined chemical and immunochemical procedure *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **70**, 804.

Seaman, E., Van Vunakis, H. and Levine. L. (1965). Antigenicity of polyribonucleotides. *Bi chemistry* 4, 1312.

Sela. M., Ungar-Waron. H. and Shechter. Y. (1964). Uridine-specific antibodies obtained with synthetic antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **52**, 285.

Seligman, M. (1957) Mise en évidence dans le Sérum de Malades Atteints de Lupus Erythemateux Dissénime d'une Substance Déterminant une Réaction de Precipitation Avec l'Acide Désoxyribonucleique. *C. R. Acad. Sci.* (Paris) **245**. 243.

Sinai, Y., Lachman. C. and Cohen, S. (1965). Effect of purinoyl human serum albumin on transplanted Erlich ascites tumour in mice. *Nature* **205**, 192.

Stollar. B. D. (1970). Double-helical polynucleotides: immunochemical recognition of differing conformations. *Science* **169**, 609.

Stollar, D., Levine, L. and Marmur, J. (1962). Antibodies to denatured DNA in lupus erythematosus serum. II. Characterization of antibodies in several sera. *B. B. A.* **61**, 7.

Stollar, D. and Levine, L. (1963). IV. Evidence for purine determinants in DNA. *Arch. Biochem.* **101** 417.

Stollar, B. D. and Raso, V. (1974). Antibodies recognize specific structures of triple helical polynucleotides built on poly (A) or poly (dA). *Nature* **250**, 231.

Tan, E. M. and Natali. P. G. (1970). Comparative study of antibodies to native and denatured DNA. *J. Immunol.* **104**, 902.

Ungar-Waron, H., Hurwitz, E., Jaton, J. C. and Sela, M. (1967). Antibodies elicited with conjugates of nucleosides with synthetic polypeptides. *B..B. A.* **138**, 513.

Van Vunakis, H., Seaman, E. and Levine. L. (1968). In: "Nucleic Acids in Immunology." p. 58.

Wallace, S. S., Erlanger, B. F. and Beiser, S. M. (1971). Antibodies to nucleic acids. Immunochemical studies on dinucleoside phosphate-protein conjugates. *Biochemistry* **10**, 679.

Young, J. T. and Samejima, T. (1969). Optical rotatory dispersion and circular dichroism of nucleic acids. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **9**, 223.

第四章　细胞表面抗原

有机体的重要免疫学功能是识别细胞的个性。细胞的个性集中表现在细胞表面。在高等动物细胞，血型抗原、组织相容性抗原、器官（组织）专一抗原、物种专一抗原，以及对病毒、植物血球凝集素的受体等细胞表面抗原的总和构成了细胞的个性。遗传变异、病毒感染和癌变等病理过程也可以从细胞表面抗原的改变中精细地反映出来。另一方面，识别细胞个性的功能又是一般细胞表面的基本特性。个体的形成（海绵）、受精、组织细胞间的选择亲合都是细胞表面这种基本特性的表现。这种特性在免疫活性细胞得到最高度的发展，这些细胞表面出现类似免疫球蛋白的特殊受体，能识别"自我"和"非我"的细胞或其他抗原。因此，各种基本的免疫生物学现象，诸如抗原的识别，抗体和补体对细胞的亲合，与此有关的吞噬、凝集和免疫附着现象等，以及病毒感染、细菌或植物毒素、植物血球凝集素对细胞的专一作用，无一不是和细胞表面抗原有密切关系的。

本章主要从细胞表面分子构造的现代概念出发，简略地讨论几种主要的细胞表面抗原（细胞表面的抗原结构）以及细胞表面受体的概念。至于淋巴细胞表面的抗原识别受体，将留待有关章节再作专门的论述。

一、细胞表面分子构造的现代概念

细胞表面的分子构造很复杂，至今还不甚清楚。但已知多糖分子（主要以糖蛋白或糖脂形式存在）在细胞表面有关的免疫生物学现象中起重要的作用。过去关于细胞膜分子构

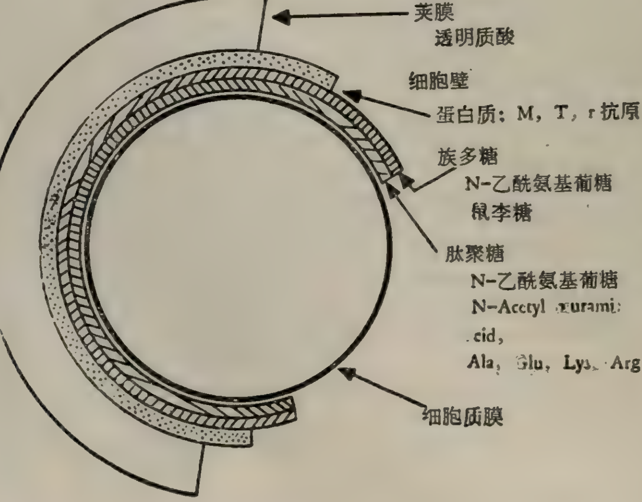


图 4-1　A族溶血性链球菌细胞表面构造简图（据 Krause, 1972）。

造的学说，大都忽视了多糖，因而不能全面地反映细胞表面构造和解释细胞的各种免疫学功能。

所谓细胞表面是指细胞与环境间的界面构造，包括质膜及其外层的大分子构造。原核细胞(如细菌)，质膜外面还有细胞壁及荚膜。如前所述(73 页)，细胞壁内含有血清学专一的胞体脂多糖抗原(族抗原)和蛋白质抗原以及肽聚糖骨架(图 4-1)。真核细胞(如高等动物)只有质膜及其外被(Cell coat)，有时合称为较厚膜，或简称为细胞膜。真核细胞的细胞膜具有复杂的结构和多种功能，包括物质交换、信息传递、能量转换、分泌排泄、兴奋传导、运动以及各种免疫学功能(抗原识别、吞噬、凝集、附着等)。这里主要讨论与细胞表面的抗原结构和免疫学功能有关的细胞膜的构造问题。

(一) 细菌细胞壁的分子构造模型

根据对大肠杆菌以及沙门氏菌细胞壁化学构造的分析，Braun (1973) 提出了细菌细胞壁的分子构造模型(图 4-2)。简略地说，细胞壁的骨架是由一层肽聚糖网 (Murein net)(其上均匀地连接着大约 250,000 脂蛋白分子)构成的。肽聚糖网是许多多糖链被短肽共价连成的一个把整个细菌表面包裹起来的网袋。每一条多糖链又是由许多双糖单位 (-N-乙酰-muramyl-N-乙酰氨基葡糖-) 构成的。每一个双糖单位的长度为 10.3 Å。相邻的多糖链是由短肽 (-L-Ala-D-Glu-meso-DPM-D-Ala-) 通过 meso-二氨基庚二酸 (meso-DPM) 的光学不对称中心的氨基和 D-丙氨酸末端的羧基间形成的肽键连接的(图 4-4，图 4-5)。相邻的两条多糖链之间的间距约为 12—13 Å。脂蛋白分子是通过其肽链 C 末端 Lys 的 ε 氨基取代肽聚糖网上的丙氨酸而和 meso-二氨基庚二酸的羧基相连的。据统计每隔 10 或 12 双糖单位的地方就有一个脂蛋白分子和肽聚糖网共价连接。由此脂蛋白分子之间的间距约为 100—120 Å(图 4-3)。由于整个骨架是通过共价键相连而成，可以看作一个结构坚实的巨分子(分子量≑$1—4\times10^9$)。因此甚至在剧烈条件处理时，如 4% 煮沸的硫酸十二烷基钠提取时，它仍能保持完整的构造。这时所有细胞壁外层的其他成分(脂多糖、蛋白和磷脂)都被溶解，只剩下一层肽聚糖-脂蛋白网。只有再用胰蛋白酶和溶菌酶处理，才能把网架进一步拆散，得到游离的短肽聚糖。这也就是相当于下一章将要提到的细菌的佐剂有效成分(参看 160 页)。

每一个脂蛋白分子通过 C 端的 Lys 和肽聚糖网连接，而 N 端通过丝氨酸和类脂相连。类脂可能主要含棕榈酸和一个未知的化合物(或许是一个 α-氨基多羟基碳酸)。脂蛋白的构造特点是其多肽顺序表现明显的重复性。从图 4-2 可见，从肽链的第 3 个残基开始，相连的两段(14—15 残基)几乎有相同的顺序，续后还存在四段顺序相似的短肽段。只有和类脂相连的 N 端(类脂-(ser)-ser) 及和肽聚糖网相连的 C 端 (-tyr-Arg-Lys-肽聚糖网)才不表现重复性。

脂蛋白的另一个重要的构造特点是分子构象上的两面异性 (Amphipathic properties)，即分子的一面为疏水的，另一面为亲水的。这是由于多肽链每隔 2—3 个残基，即每逢第 4 (或第 3) 氨基酸残基便具有疏水性侧链，也就是平均约每 3.5 氨基酸残基有一个疏水性侧链。由于每 3.6 氨基酸残基构成 α-螺旋的一圈，只要脂蛋白具有 α-螺旋构象，所有疏水性残基都将分布在 α-螺旋的一面。实际上，圆二色性测量的结果表明脂蛋

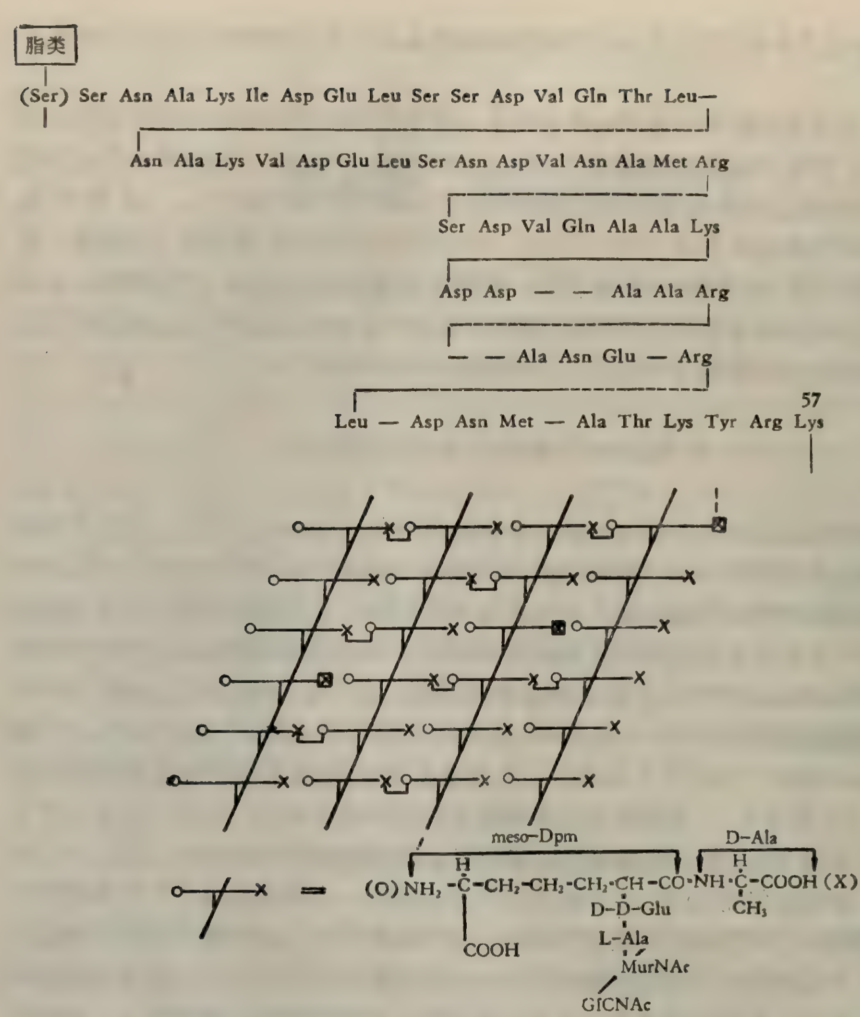


图 4-2 肽聚糖网及相连的脂蛋白分子的模式图。平行的粗线示多糖链，它们被“T”字形的短肽侧链相连成网状。“T”字形侧链的平均长度约为 12.4Å(青霉素的抗菌作用就是由于它能阻止侧链的连接，因而导致细胞的解体)。平均每 10—12 个双糖单位，便有一个脂蛋白分子连接。脂蛋白通过其C端 Lys 的 ε 氨基取代肽聚糖网上的丙氨酸，而和m-二氨基庚二酸 (meso-DPM) 的羧基相连接。脂蛋白的多肽按最大同源性排列，以显示其重复结构(据 Braun, 1973)。

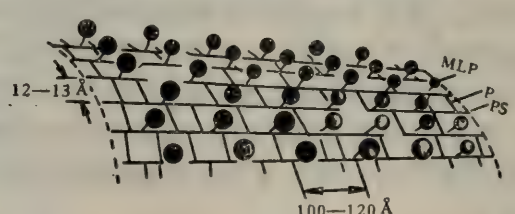


图 4-3 脂蛋白分子在肽多糖网上的分布。两个脂蛋白分子在网上分布间隔约为 100—120Å，而多糖链间的距离为 12—13Å。(MLP) 脂蛋白；(P) 短肽；(PS) 多糖链 (Braun, 1973)。

白确有高度的 α-螺旋构象(至少大于 70%)。脂蛋白的这种特性对细胞壁的结构有着重要的意义。从免疫学研究证明，这些脂蛋白分子可能从细胞壁的最内层延伸到表面。由于脂

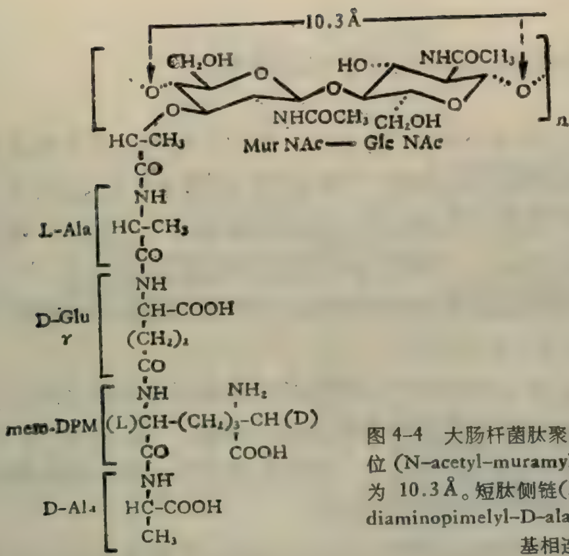


图 4-4 大肠杆菌肽聚糖的重复双糖单位的构造。双糖单位 (N-acetyl-muramyl-N-acetyl-glucosamine) 的长度为 10.3 Å。短肽侧链(L-alanyl-γ-D-glutaminyl-meso-diaminopimelyl-D-alanine) 和 muramicacid 的乳酰基相连(据 Braun, 1973)。

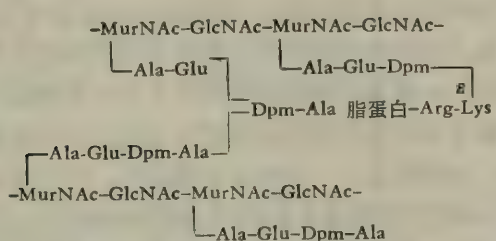


图 4-5 相邻两条多糖链之间的连接方式。多糖链是 N-acetylmusamyl-N-acetylglucosamine (MurNAc-GlcNAc) 双糖单位的多聚体。短肽侧链通过 m-二氨基庚二酸 (Dpm) 的光学不对称中心的氨基和末端 D-丙氨酸的羧基形成的肽键相连接。脂蛋白通过末端 Lys 的 ε 氨基和肽聚糖连接(据 Braun, 1973)。

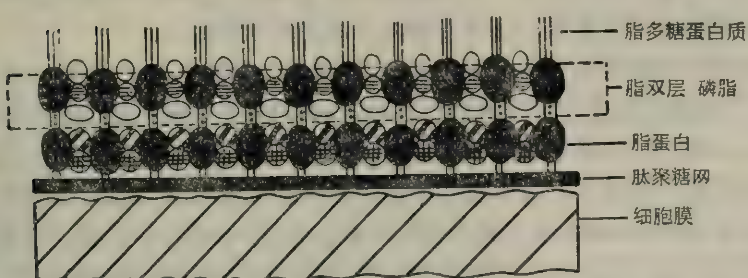


图 4-6 大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞表面分子构造模型。外层是细胞壁，内层是细胞膜。分布在肽聚糖网上的脂蛋白在细胞壁的建造中起支柱作用，其他细胞壁结构成分，围绕脂蛋白排布。脂蛋白N端的类脂和脂双层内脂多糖的类脂 A 相互作用，并和磷脂一起构成脂双层(据 Braun, 1973)。

蛋白分子的两面异性，一面亲水，另一面疏水，细胞壁的其他结构成分，如脂多糖、磷脂、蛋白等就可能围绕脂蛋白分子排布，即以脂蛋白分子为中心构成一个共价结合的组成细胞壁的亚基。根据这一结构概念，设想的细菌细胞壁的分子构造模型，可用图 4-6 表示 (Braun, 1974)。

（二）真核细胞细胞膜的分子构造模型

经典的细胞膜分子结构模型，如 Danielli-Davson（1934）模型，认为膜是由蛋白质和脂质组成，蛋白覆盖在脂双层的外面，构成“三夹板”模型(图 4-7 B)。后来，有人根据电子显微镜观察提出“单位膜”概念，认为各种生物膜普遍具有 75—100 Å 厚的三层结构（20 Å—35 Å—20 Å）（Robertson，1966），以及胶粒结构模型(图 4-7,C)。这几种模型都是以脂质为主体的，没有考虑到蛋白和多糖的重要作用，因而不能解释和细胞膜有关的各种免疫学现象，特别是专一性和行为。

现代细胞膜结构的新概念是建筑在对细胞膜各种组分的深入研究基础上的。已知细胞膜主要是由蛋白质和脂质构成，此外还含有少量的多糖和核酸。蛋白质约占60—75%，脂质占25—40%，多糖等其他成分约占5%。多糖含量虽少，但对细胞膜的专一性和行为有很大关系，对膜的结构概念产生很大的影响。

用 X 射线衍射技术研究细胞膜中磷脂的排列证明，细胞膜中的磷脂是平行的双分子层，极性头排在双层的表面(和水溶液接触)，脂肪酸的烃链朝向内部。旋光色散和圆二色性谱测定膜蛋白表明，蛋白质的肽链有相当大量的 α-螺旋构型，而没有 β-折叠。光谱观察还进一步指明，蛋白质的 α-螺旋与脂质的疏水区之间存在很强的相互作用。因而膜蛋白不是像以前假设的覆盖在脂双层表面的伸展的 β-构型，而可能是球形。膜蛋白质按其与脂质相互作用的方式，分为两类：一类称为外周蛋白；另一类称为固有蛋白。外周蛋白的特性是能溶解于水，通过较弱的非共价键(主要是静电相互作用)结合于膜的表面，因而只需要某些温和的处理，例如改变溶液环境的离子强度或 pH，加人金属螯合剂等，就能使它们从膜上溶解下来。如神经髓鞘的碱性蛋白属于这一类。固有蛋白的特性是疏水性，它们插入到脂双层中，有的甚至贯穿整个膜的厚度。这些蛋白质含有较多的疏水性残基，靠和磷脂的非极性基团之间的疏水性相互作用而与膜结合，因而只有用表面活性剂、有机溶剂抽提等较剧烈的处理，才能把它从膜上“溶解”下来。两类蛋白质和膜的结合方式不同，分离的方法也不同。这对于膜的分离是很重要的。

用不能穿透细胞膜的放射性蛋白试剂(甲酰甲二磺酰砜甲基磷酸)，标记完整红血球(仅细胞膜外表面的膜蛋白能与试剂反应)和分离的红血球细胞膜(膜内、外两表面都能和试剂反应)，结果表明，红血球膜的内、外两表面蛋白质分布是不对称的，并且有的糖蛋白分子贯穿整个膜的脂双层。这些蛋白质分子的亲水性氨基酸和疏水氨基酸在蛋白链的两端还可能不对称的分布，亲水性部分包括多糖基团，位于膜的外表面，而疏水性部分埋到膜内。露出在外表面的部分为不规则线团状，易被蛋白酶酶解，贯穿膜的部分可能呈 α-螺旋状(图 4-7 D)。应用电子显微镜“冰冻蚀刻”技术，同样观察到膜蛋白嵌入到膜内。这种方法利用低温使标本的疏水键大大减弱，切片时裂面因而总是沿着膜的脂双层疏水区中间劈开(图 2-7 E)。露出的裂面再经过金属投影，制作铂摹本后，就可用于电子显微镜观察。于是就可以观察到膜内的裂面上散布着大量球形颗粒（50—85 Å)。用标记抗体示踪法，还可以证明它们是糖蛋白或糖脂蛋白性质的(参看 132 页)。

此外，许多细胞学现象表明，细胞膜是一个动态结构。小鼠和人的融合细胞，用萤光标记抗体追踪专一的表面抗原，发现开始时小鼠和人的抗原各居融合细胞表面的一半，

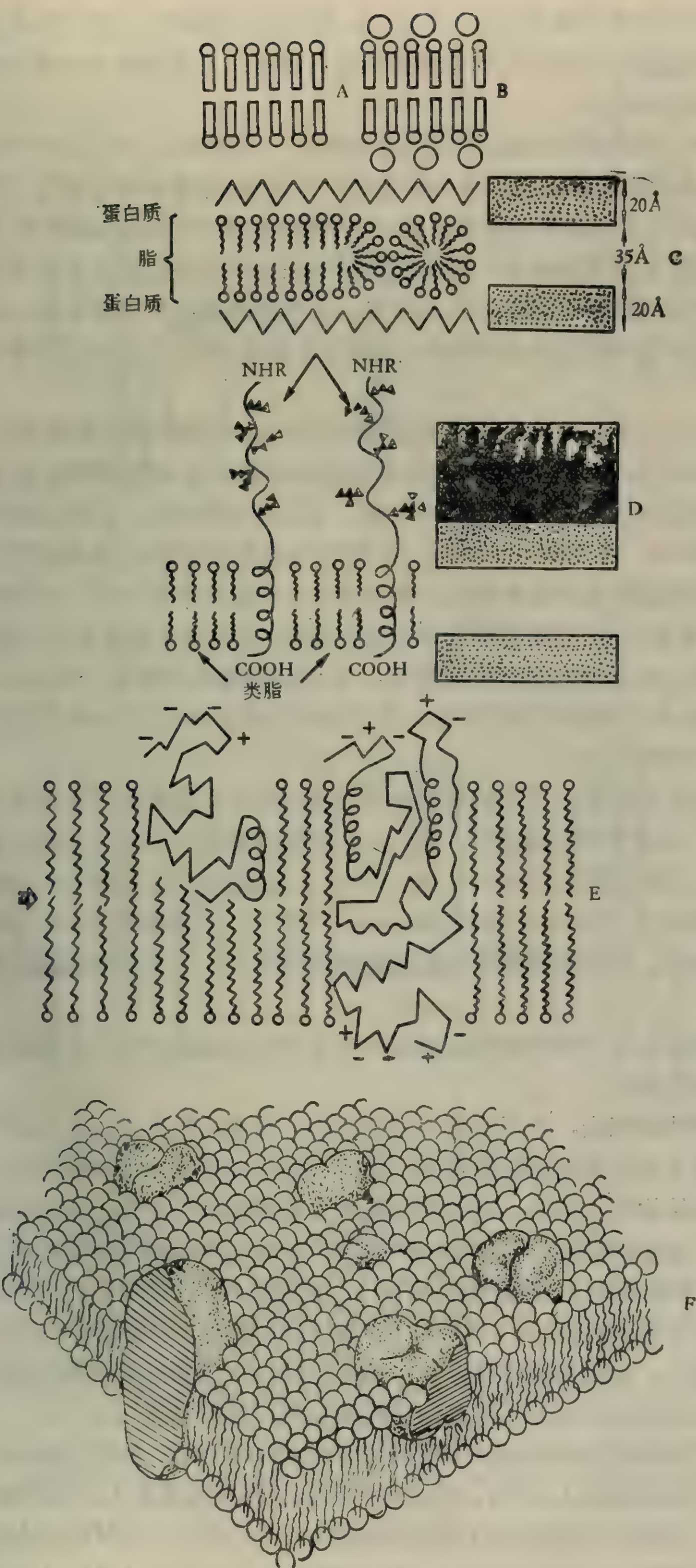


图 4-7 细胞膜结构模型。(A) Gorter 和 Grendel(1925) 提出的脂双层模型。小圆球代表极性基团,排列朝水相。长方棒代表脂肪酸烃链,朝内相向排列。(B) Danielli-Davson (1934) 模型。脂双层的极性基团被亲水性蛋白包盖(大圆球表示)。(C) Lucy(1968)模型。球形脂胶粒和脂双层构造处于动态平衡。简图右侧表示膜的超薄切片的电子显微镜图象是总厚度为 75—100 Å 的三层结构。这种构造称为单位膜 (Robertson, 1966)。(D) 糖蛋白分子嵌于脂双层内的模型。三角代表糖残基。简图右侧示钌红染色后膜在电子显微镜下的形态。(E) Singer-Nicolson(1972) 流动镶嵌模型(横切面)。疏水的球形固有蛋白和不连续的脂双层的镶嵌结构。固有蛋白在膜内嵌入的深度依分子的大小和构造而定。箭头示冰冻蚀刻的裂面。(F) 流动镶嵌模型(立体及横切面),示固有蛋白(表面点小点)在脂双层膜内的分布(据 Cook 和 Stoddart, 1973; Singer 和 Nicolson, 1972)。

40 分钟（37°C）后表面抗原迅速融合镶嵌排列（Frye & Edidin，1970）。进一步实验证明，代谢抑制物不影响表面抗原的流动，而低温却能影响其流动。这支持膜内的蛋白能在一个粘度大的介质内漂移的看法。

概括这些事实，Singer 提出膜结构的“流动镶嵌模型”（Singer 和 Nicolson，1971），主张膜的基本结构是球形的疏水性蛋白，镶嵌在脂双层内，球蛋白极性部分（包括多糖）位于水相，而疏水部分则埋在膜的疏水区内，也可能贯穿整个膜的脂双层（图 4-7E,F）。膜蛋白在膜内外的分布是不对称的。疏水的膜蛋白在脂双层中还能在水平方向漂移。这一模型的优点是考虑到细胞膜内糖蛋白的存在，并把膜视为一个动态结构。因而能较好地解释许多和细胞表面有关的免疫学现象，如饮液和吞噬作用，以及表面受体的移动等。

吞噬作用通常可分为两步：颗粒选择地附着到吞噬细胞表面；带着颗粒的质膜内陷，然后与溶酶体融合，颗粒被消化。某些细胞亲合抗体能加强吞噬细胞对附着颗粒的反应。和颗粒选择地接触的细胞表面受体的性质还不清楚。不过有证据表明，它们直接或间接地和糖蛋白有关系（Allen 和 Cook，1970）。吞噬活动的发动过程，有人假定首先是细胞亲合抗体的 Fc 和巨噬细胞表面受体亲合。膜上的抗体的抗原结合位点，再与抗原结合时，抗体分子发生构象变化，引起横贯细胞膜的蛋白簇集，形成离子通透管道，钙离子进入细胞，因而引起邻近的肌动球朊微纤维的收缩，结果细胞膜带着颗粒一同陷入。刀豆凝集素（Concanavalin A）能抑制吞噬活动，这可能是和膜受体相互作用，因而限制了膜成分的移动（Allison 等，1971）。

淋巴球表面存在类似抗体的受体。当用抗表面免疫球蛋白的抗体处理时，这些表面受体便簇集在细胞的一极，形成所谓的“极冠”。然后，这些免疫球蛋白分子可以通过饮液活动，进入细胞内部，而从表面消失（Taylor 等，1971）。低温（0°C）或用刀豆凝集素处理，都能抑制“极冠”的形成（Yahara 和 Edelman，1972）。这表明膜上的免疫球蛋白受体的自由扩散受到抑制。这些事实都是和流动镶嵌模型符合，为经典的膜结构模型所不能解释的。

总之，细胞膜的结构模型必须考虑到细胞表面活动的专一性和动态过程，才能较好地解释和膜有关的各种免疫学现象。

最后，还要谈到细胞膜结构概念，对于细胞表面抗原的分离纯化的意义。为了研究细胞表面抗原的化学性质，首先就必须把它们从膜上溶解下来，并尽可能得到最大的产量和保持原来在膜上的天然结构和抗原性。根据前述膜蛋白和膜的结合方式，以及在膜上排列的特点，一般说来，溶解膜抗原主要采取两类方法：解离非共价键和破坏共价键（蛋白酶酶解）。如前述，外周蛋白通过较弱的非共价键（主要是静电相互作用）和膜表面结合，因此只需要较温和的方法，通常是用 3*M*KCl 处理就能把它们从膜上溶解下来。膜上的固有蛋白深埋于脂双层内，靠疏水性相互作用，和膜牢固结合，就需要较剧烈的处理，如用去氧胆酸、NP-40，Triton X-100 等表面活性剂处理，才能溶解。

比较用三种不同的方法，溶解同一种细胞（小鼠浆细胞瘤 MOPC-460）的膜抗原的效果时，可看出表面活性剂去氧胆酸钠（DOC），所溶解的细胞膜蛋白的量最大，达到膜蛋白总量的 80%，而 3*M*KCl 和木瓜蛋白酶处理各自只能溶解 16% 和 10%。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳表明，DOC 溶解的蛋白成分最多，分子量也较大，至少要比 3*M*KCl 处理

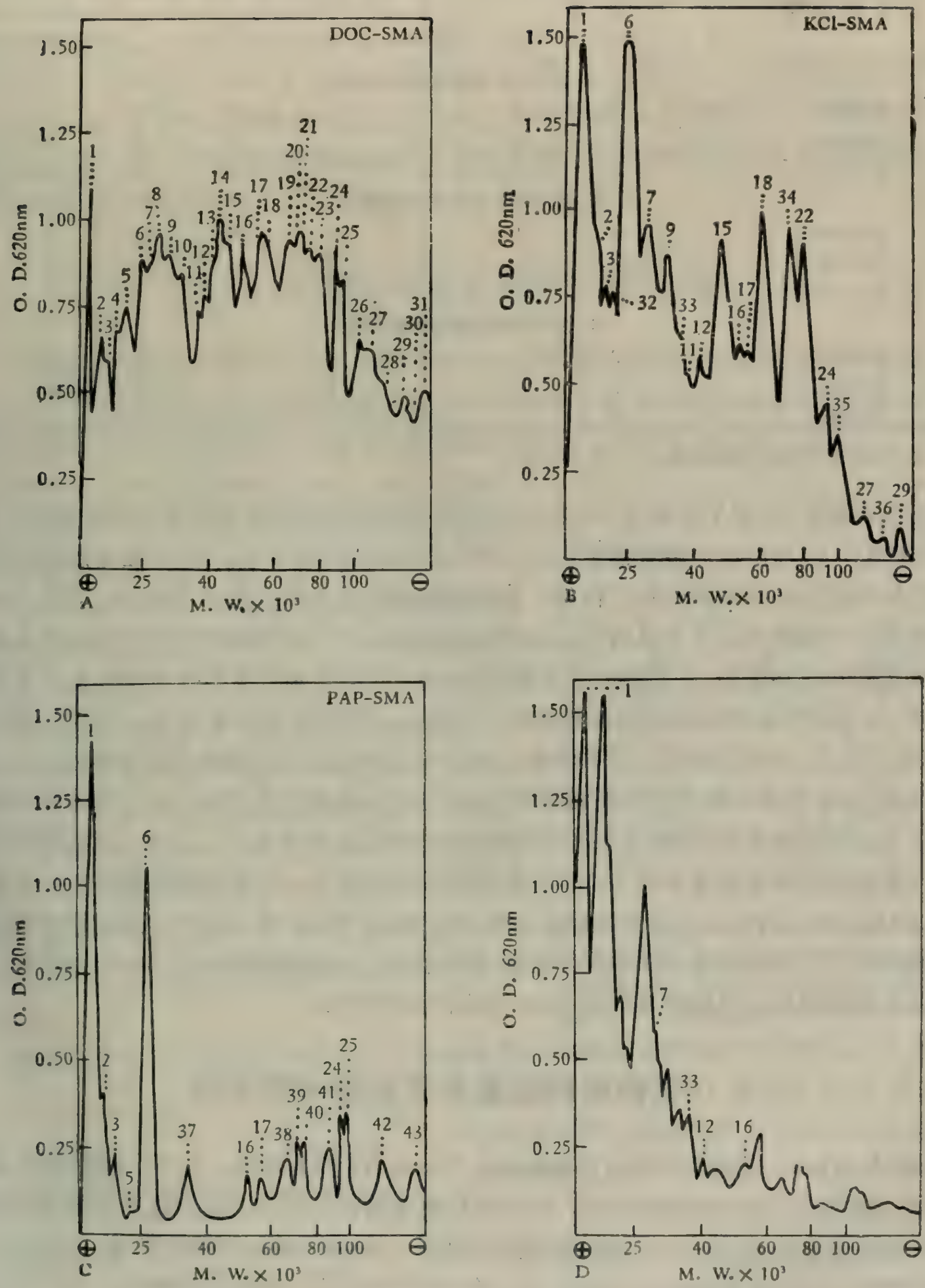


图 4-8 不同方法溶解的膜蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。(A) DOC 溶解的膜蛋白。区分出 31 条分子量不同的带，并按相对迁移率依次编号 (B—D 采用同样的编号，以便互相比较)。凝胶柱顶端在图的右方。(B) 高离子强度 (3*M*KCl) 溶解的膜蛋白。编号大于 31 的带不存在于 DOC 和木瓜酶消化的电脉图形中。(C) 木瓜酶消化 (37℃,15 分钟)。编号大于 36 的带不存在于 DOC 和 KCl 电泳图形中。(D) 3*M*KCl 溶解的膜蛋白在 4℃ 长时间存放。未标明号码的峰指示 C 中未发现过的带。这种变化是由于内源酶解的结果(据 Prat 等,1975)。

表 4-1 不同方法溶解的膜抗原与它们相应的抗血清之间的交叉沉淀反应和交叉吸收

家兔抗血清	未吸收	用下列膜抗原吸收		
		DOC	KCl	PAP
A. 用 KCl 溶解膜抗原测试				
抗-DOC	3*	—	0	1
抗-KCl	4	0	0	1
抗-PAP	2	0	0	0
B. 用 DOC 溶解膜抗原测试				
抗-DOC	3	0	0	1
抗-KCl	3	0	—	2
抗-PAP	2	0	0	0
C. 用木瓜酶溶解膜抗原测试				
抗-DOC	2	0	0	0
抗-KCl	2	0	0	0
抗-PAP	2	0	0	—

* 染色后计数的沉淀线数目(据 Prat 等,1975)。

要多 9 个蛋白成分(图 4-8 A,B)。然而，DOC 溶解的蛋白对家兔的免疫原性较弱,并不比用 3*M*KCl 处理溶解的膜蛋白能引起更多的沉淀抗体(表 4-1)。DOC 由于剧烈地干扰细胞膜结构成分间的疏水性相互作用，能同时使固有蛋白和外周蛋白溶解。其优点是溶解的膜蛋白产量最高，分子量较大,比较能反映抗原大分子在膜上的存在形式,但其缺点是溶解下来的成分过杂,不易进一步分离纯化,并且 DOC 还可能和膜蛋白结合，影响免疫原性。3*M*KCl 处理比较能选择地溶解外周蛋白，膜脂蛋白释放减少，便利以后的分离纯化。不过由于内在酶解，还可能有一部分埋在脂双层中的固有蛋白也释放出来。至于木瓜酶,主要是将外露在细胞表面的多肽链在原位,或溶液中切断。由于低聚糖在糖蛋白分子上的不对称分布,溶解下来的断片的糖含量较高(图 4-8，C)。这一方法得到的膜蛋白产量最低，并且出现许多 DOC 处理时所没有的成分，主要是被降解的低分子量的多肽（Prat 等，1975）。由于各种方法的作用方式不同,从膜上溶解下来的解离程度不等的抗原断片，其分子量大小和化学组成也不相同,各实验室报告的结果,很难比较。这是在研究膜抗原时，最感困难的地方,也是应注意的地方。

二、植物血球凝集素及细胞表面受体

Boyd（1945）发现利马豆（*Phaseolus limensis*）的提取物，能专一地凝集人 A 型红血球。继之进行的广泛研究发现，许多豆科植物的种子都含有能和红血球或其他细胞表面的糖残基专一地结合，引起细胞凝集的物质，统称为植物血球凝集素（Phytohemagglutinin，简称 PHA）。其实，这一名词并不确切，因为在动物组织,如软体动物的蛋白腺、鱼卵也有这一类物质存在。因此,有人主张似乎用选择素（Lectin）一词较为妥当（Boyd，1962）。

植物血球凝集素能和细胞表面特殊的抗原的一定糖残基专一地结合。细胞表面的这种特殊构造，称为植物血球凝集素受体（PHA receptor site)。各种 PHA 具有不同的结合专一性。用萤光染料或同位素标记已知专一性的 PHA，就可以用来显示细胞表面

的一定糖残基或低聚糖的分布或动态变化。如用铁蛋白或过氧化物酶标记时，更可以用电子显微镜作分子水平的定位观察。因此，对于分析正常和恶性细胞表面的多糖分子构造是很有用处的。故有人形象地称之为细胞表面的“分子探针”。

此外，一些植物血球凝集素能和淋巴球表面受体专一地结合，并刺激这些细胞的分裂活动。因此，对植物血球凝集素及其受体相互作用的研究，不但有助于了解细胞膜的多糖构造，而且有助于了解这些构造如何参与细胞的功能活动，特别是淋巴球表面受体接受抗原刺激而起反应的机制。

（一）植物血球凝集素多糖结合点的性质

各种植物血球凝集素结合专一性的研究方法，同样采用研究同族凝集抗体和血型物质结合专一性时采用的半抗原抑制法。即用各种单糖、低聚糖或从细胞表面分离的糖多肽测定其对 PHA 引起的细胞（通常是用不同血型的红血球）凝集作用的抑制能力。根据这种方法测定的结果，一些常用于细胞表面研究的植物血球凝集素的结合专一性，列于表 4-2。

对于一些 PHA，单糖和有关的低聚糖有同等的抑制能力，而在另一些 PHA，低聚糖的抑制能力要比单糖强几千倍。例如，具有 A 血型专一性的双花扁豆凝集素，A 专一性的 5 聚糖的抑制能力只比有关的单糖甲基-α-D-GalNAc 强两倍。反之，从人红血球细胞膜提取出的一个糖多肽，对四季豆凝集素的抑制能力要比有关的单糖约强 3,000 倍(Kornfeld 和 Kornfeld，1969)。根据这些结果推测，前一类 PHA 似乎只和一个糖残基结合，后一类则可能要求和两个以上的残基结合。

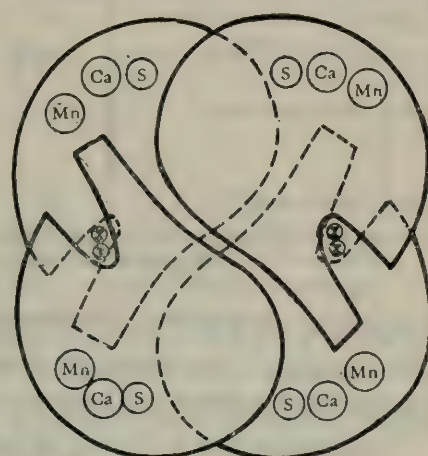


图 4-9 洋刀豆凝集素（ConA）四聚体模型，从 z 轴的俯视图。过渡金属、钙和糖基团的结合位点分别用 Mn、Ca、S 表示，I 为 β-IPG (O-碘苯基—β-D-吡喃葡糖苷)(据 Becker 等,1975)。

植物血球凝集素的细胞结合专一性和凝集能力，是与其特殊的分子构造有关系的。刀豆凝集素（Con A）的高分辨率（2 Å）X 射线晶体学分析发现，分子是由 4 个球形亚基构成的。每一个亚基有一个大小约为 6 Å × 7.5 Å × 18 Å 的袋形构造。从 β-IPG 和 Con A 复合物上标记原子的位置看来，这一袋形构造似乎是糖结合位点。金属原子 (Mn^{++}，Ca^{++}) 和结合位点相距约 20 Å，不参加和糖的结合（Edelman 等，1972）。可是，同一实验室后来却认为糖结合位点是位于金属原子附近的残基，和 Mn^{++} 相距约 13 Å，而不是象从前曾认为的位于袋形构造内。金属原子可能直接对维持糖结合位点的构象起重要作用(Becker 等,1976)(图4-9)。

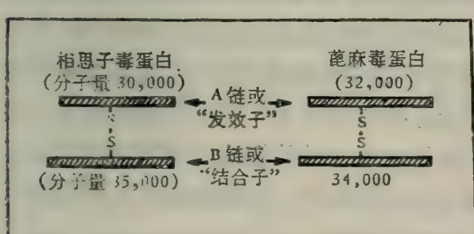


图 4-10 相思子毒蛋白和蓖麻毒蛋白分子结构简图(据 Olsnes 等,1974)。

表 4-2 细胞表面研究中常用的几种凝集素

来　源	具有广泛专一性的纯化凝集素的特性				
	名　称	分子量	亚基	糖专一性	结合位点数目
洋刀豆 (*Canavalia ensiformis*)	ConcanavalinA	55,000 110,000	2 4	α-D-man α-D-Glc	2 4
大豆 (*Glycine max*)		110,000		D-GalNAc	2
扁豆 (*Lens esculenta*)		42,000—69,000	2	α-D-man	2
小麦 (*Triticum vulgaris*)	WGA	26,000		$(D\text{-}GlcNAc)_2$	
蓖麻 (*Ricinus communis*)	Ricin	120,000 60,000		β-D-Gal β-D-Gal.D-GalNAc	

具有血型专一性的凝集素

来　源	专一性		备　注
	人类血型	糖专一性	
双花扁豆 (*Dolichor biflorus*)	A	α-D-GalNAc	主要为 A_1 专一性，对 A_1 红血球的亲合力比 A_2 大 500 倍。
欧洲百脉根 (*Lotus tetragonolobus*)	H(O)	α-L-Fuc	
禾草豆 (*Vicia graminea*)	N	$Gal\xrightarrow[\beta]{1-3}GalNAc\xrightarrow[\alpha]{}$	与 M 红血球性有弱的交叉反应
蜂宝花 (*Iberis amara*)	M	NANA α | 2-6 $Gal\xrightarrow[\beta]{1-3}GalNAc\xrightarrow[\alpha]{}$	

NANA = N－乙酰神经氨酸 (N-acetyl-neuraminic acid)。
(据 Cook 和 Stoddart, 1973)。

和抗体相似，四聚体 Con A 分子和糖的结合价数是多价的，因而能使细胞凝集；解离成单价的亚基后，虽然仍旧能和特定的糖残基结合，但不再能凝集细胞。这和同族凝集抗体的凝结血球的机制也是相似的。

和植物血球凝集素有关的，植物毒蛋白，如蓖麻毒蛋白（Ricin）和相思子毒蛋白（Abrin），对细胞的毒性作用似乎也有一定的专一性，并且对肿瘤细胞比正常细胞有较大的毒性。对其分子结构的研究发现，它们是由两条肽链组成的(图 4-10)。B 链具有和植物血球凝集素相同的结合专一性；能和细胞表面含半乳糖的受体专一地结合，因而可称为结合子（Haptomer）。A 链有毒性活力，能破坏核糖核蛋白体，抑制蛋白质合成，因而可称为发效子（Effectomer）。当用巯基乙醇，将 A 链和 B 链拆开，单独的 A 链不能和细胞表面结合，因而不能进入细胞，发挥其毒性作用。重结合的蛋白，又恢复其毒性活力。蓖麻毒蛋白的 A 链和相思子毒蛋白 B 链构成的杂种分子，也保持原来的毒性作用（Olsnes 等，1974）。这些实验结果对于寻找有细胞专一性的抗癌药物有一定的启发。可以设想也许有可能利用某种和癌细胞有结合专一性的植物血球凝集素的亚基作为“结合子”，和毒蛋白的“发效子”人工地构成一个杂种分子，便能够选择地杀伤肿瘤细胞。

（二）细胞表面的 PHA 受体

Kornfeld 实验室用胰蛋白酶处理人红血球细胞膜，分离出一个糖多肽，能和四季

豆凝集素 E-PHA 专一地结合(图 4-11)；并能抑制 E-PHA 引起的血球凝集反应。其抑制能力比有关的单糖（β-D-半乳糖）强约 3,000 倍。根据顺序酶解法测定，红血球膜 E-PHA 受体的结构如图 4-12 所示，低聚糖链很可能通过 N-乙酰氨基天门冬氨酸键和多肽链相连。去除此低聚糖链末端的唾酸残基，不影响对红血球凝集的抑制能力。然而，去除半乳糖残基，抑制活力就降低 70%。这些结果说明半乳糖残基在受体和 E-PHA 的结合中起主要作用。不过低聚糖链内部的糖残基，尤其是甘露糖残基对结合专一性也有一定影响。所以，四季豆 E-PHA 的结合点可能比双花扁豆凝集素的结合点更复杂，后者的结合点可能只和末端的一个单糖有关系（Kornfeld 和 Kornfeld，1971)。

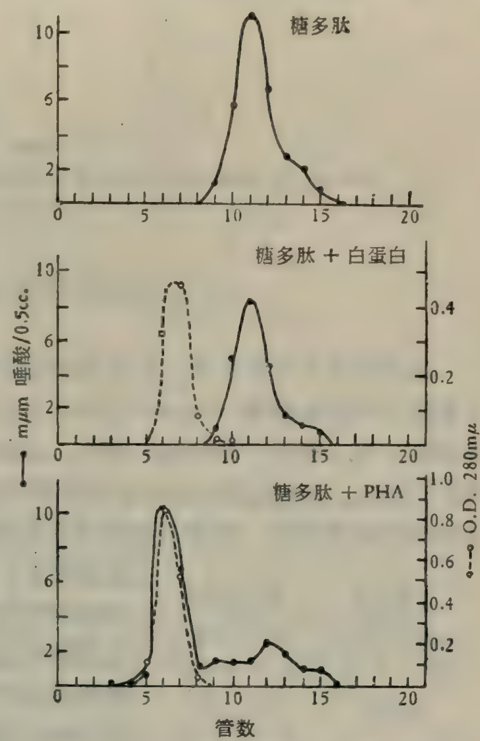


图 4-11 纯化的红血球膜糖多肽和四季豆 E-PHA 的专一结合。糖多肽单独，或加白蛋白或 PHA 保温一小时(37℃)，然后经 Sephadex-G-75 凝胶过滤，测唾酸含量定糖多肽的位置，测 280 mμ 光密度定白蛋白和 PHA 的位置。糖多肽和 E-PHA 结合，因而改变洗脱的位置(据 Kornfeld 和 Kornfeld，1971)。

对各种细胞研究的结果表明，不同细胞(如淋巴球、血小板等)的同一种 PHA 受体可能有相似的或相同的结构，不过在细胞表面的密度可能不同；而同一种细胞表面上的不同的 PHA 受体(如 Con A，WGA 受体等)，则可能有不同的结构，分布也不同。根据 ^{131}I-PHA 和细胞结合的实验，测定出人红血球表面的四季豆 E-PHA 受体的数目为 5.2×10^5，白血球为 2.7×10^6，慢性淋巴白血病淋巴球为 1.15×10^6（表 4-3)。肿瘤细胞表面受体有显著的变化，可作为肿瘤细胞的一个特征。

表 4-3 植物血球凝集素结合实验

细胞类型	PHA 来源	受体数目/细胞	结合常数 (K)
人正常淋巴球	四季豆 E-PHA	2.7×10^6	$1.1\times10^7/M^{-1}$
	L-PHA	0.8×10^6	$2.1\times10^7/M^{-1}$
	扁豆	2.4×10^6	$4.4\times10^7/M^{-1}$
慢性淋巴白血病淋巴球	四季豆 E-PHA	1.15×10^6	$1.3\times10^7/M^{-1}$
人红血球	四季豆 E-PHA	5.2×10^5	$5.7\times10^6/M^{-1}$
	L-PHA	0	
	扁豆	5.5×10^5	$1.6\times10^6/M^{-1}$
分离的红血球膜糖多肽(受体)	四季豆 E-PHA	——	$4.7\times10^3/M^{-1}$

(据 Kornfeld 和 Kornfeld, 1971)。

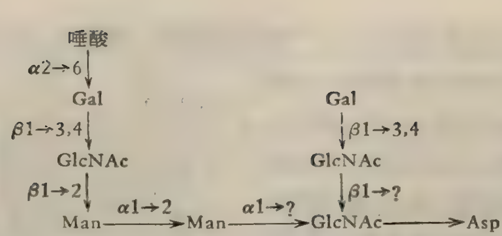


图 4-12 红血球膜糖多肽(四季豆 E-PHA 受体)的构造 (Kornfeld 和 Kornfeld, 1971)。

(三) 病毒转化的瘤细胞表面特性的变化

某些植物血球凝集素，如麦芽凝集素(简称 WGA)，能使大多数肿瘤细胞凝集，而不能使正常细胞凝集 (Aub, 1963; Burger, 1967)。这种凝集现象能被 N-乙酰氨基葡萄糖或壳二糖专一地抑制。因此，瘤细胞表面应存在含有 N-乙酰氨基葡萄糖残基的 WGA 受体。正常细胞 (如小鼠成纤维细胞 3T3株) 经病毒 (如 SV_{40}) 转化为瘤细胞，或者用蛋白酶处理后，原来不能被 WGA 凝集的细胞就变成可以凝集的了。由此推测在转化过程中，细胞表面可能发生几种变化：原来存在于正常细胞表面的 WGA 受体处于掩盖或半掩盖状态，而在转化细胞表面上暴露出来；或者分布变化、成簇排列；或者凝集位点在转化或蛋白酶处理时被激活(图 4-13)。用同位素标记的刀豆凝集素 (Con A) 和WGA (Cline 和 Livingston, 1971; Ozanne 和 Sambrook, 1971)，或大豆凝集素(Sela 等, 1971) 证明，正常细胞和转化细胞所结合的植物血球凝集素在数量上没有区别。因此，瘤细胞的凝集作用不能简单地用转化细胞表面，PHA 受体外露数目增多来解释。Nicolson (1971) 电子显微镜观察发现，正常细胞和转化细胞表面 PHA 受体的分布不同。用铁蛋白标记的 Con A 显示，小鼠 3T3 细胞表面，PHA 受体主要是随机分布的，而同一株细胞被 SV_{40} 病毒转化后，标记的 Con A 就集聚成簇的分布。正常细胞经胰蛋白酶处理后，PHA 受体也成簇分布，和转化细胞非常相似。因此，作者认为转化细胞 PHA 引起的凝集力增加是由于细胞表面 PHA 受体分布变化，集聚成簇，而不是由于外露的受体数目增多。这又可能反映了 PHA 受体在瘤变或蛋白酶处理的细胞表面上的移动能力增加 (Rosenblith 等, 1973)。还有一种可能的解释是假定细胞表面的结合点分两类：一类和植物血球凝集素结合，一类管凝集细胞。前一类结合点不受温度影响，并且在正常细胞和瘤细胞，同样有活力。后一类结合点对温度敏感，只有在瘤变或蛋白酶处理时，才被激活 (Inbar 等, 1971)。

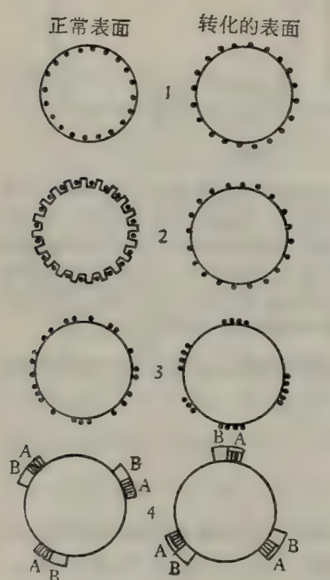


图 4-13 病毒转化的瘤细胞 PHA 引起的凝集反应增加的可能解释。(1) 掩盖模型。 (2) 半掩盖模型。(3) 重分布机制。 (4) 代谢位点可能参与 ConA 引起的凝集反应。B 位点和植物血球凝集素结合，而 A 位点决定凝集。空白区域示活动。竖线区示不活动。 胰蛋白酶可能激活 A 位点(据 Kemp 等, 1973)。

体外单层培养的正常细胞，细胞密度达到饱和，彼此接触时，细胞的生长就停止了。这一现象称为生长的接触抑制。已知这一现象和细胞表面特性有密切关系。然而，肿瘤细胞或病毒转化的瘤细胞，失去了这种类型的生长控制。这表明瘤变过程中，细胞表面特性发生了根本的变化。肿瘤细胞的侵润和转移，也都可能和细胞表面特性的这种变化有关系。

Burger (1971, b) 实验表明，肿瘤细胞的这种异常行为似乎和细胞表面抗原的变化有一定关系。从图 4-14 可见生长接触抑制的丧失程度和细胞凝集程度是平行的。因此，作者进一步假定转化细胞表面 WGA 受体的暴露和生长控制的丧失可能有关系。从这一假说出发，用单价的 Con A 处理病毒转化的肿瘤细胞，掩盖表面受体后，细胞生长的控制又恢复正常。这一实验似乎支持上述假说 (Burger & Noonan, 1970)。但是，前面已提到过，转化的细胞表面外露的 PHA 受体数目并没有变化，而是分布上有所改变(Sela 等，1971)。因此，对这一实验的解释可能并不正确。最近的实验对蛋白酶引起的细胞表面的变化和生长控制的关系进一步提出了疑问。用一种蛋白酶 Pronase 处理已停止生长的 3T3 细胞，虽然细胞被凝集素凝集的能力增加，但并不能发动生长。因此，蛋白酶引起的细胞表面的凝集特性的变化和生长控制是两回事。如果蛋白酶消化有助于解除生长的接触抑制，这可能是通过其他的机制 (Glynn 等，1973)。总之，细胞表面某些糖蛋白（如 PHA 受体）和维持生长控制的关系，还是一个很复杂的，未完全解决的问题。

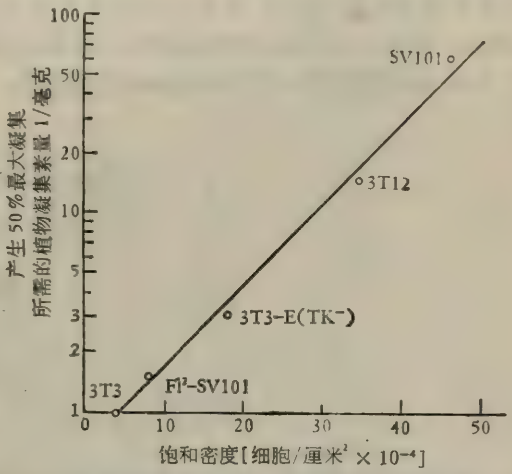
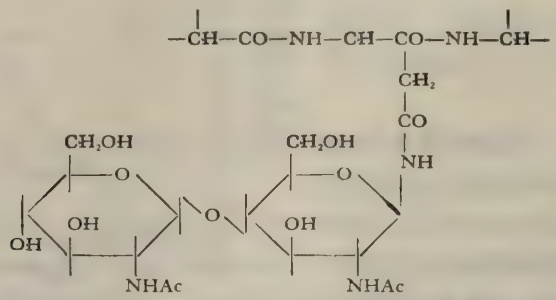


图 4-14 来源于小鼠 3T3 成纤维细胞的细胞株依赖细胞密度的生长抑制和凝集力的关系。依赖细胞密度的生长抑制的逐步丧失和凝集力的增加之间存在平行的关系。SV101为 SV40 病毒转化的 3TC 细胞，3T12 为自发瘤变的 3T3 细胞，3T3-E(TK⁻) 为酶突变细胞株，Fl² — SV101 为原来被 SV40 病毒转化的细胞，仍保留病毒基因和肿瘤专一“T”抗原，但失去高饱和密度生长能力，同时亦失去凝集能力(据 Jansons 和 Burger, 1971)。

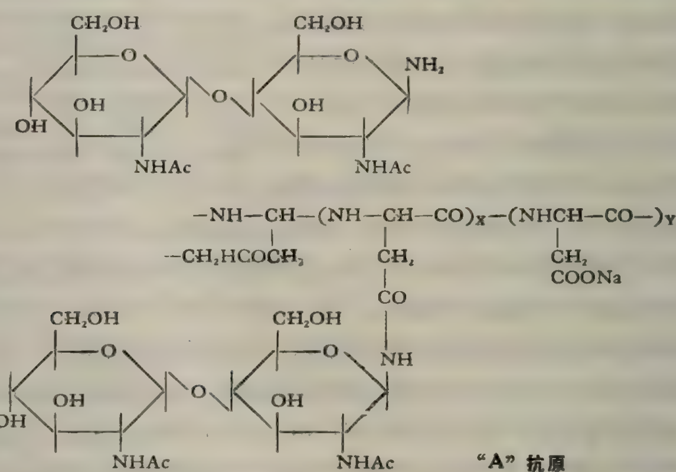
肿瘤细胞表面的另一个特点是有大量唾酸存在。恶性转变的细胞用神经氨酸酶处理，去除唾酸后，就失去 WGA 引起的凝集作用。从大鼠腹水型肝癌细胞表面，还分离出一种唾酸糖多肽，能和 WGA 结合。这些事实表明，WGA 的凝集机制可能通过唾酸。最近，进一步的研究才发现，WGA 对瘤细胞的凝集过程分两步，第一步先要和细胞表面的唾酸非专一的结合，然后才易于和细胞表面的 N-乙酰氨基葡萄糖专一的结合，造成细胞的凝集现象 (Greenaway 和 Levine, 1973)。对于瘤细胞表面特性的了解，对于控制肿瘤是有实践意义的。用神经氨酸酶处理瘤细胞可以增强细胞的抗原性，能使被免疫的动物获得免疫力，部分地或全部地抑制肿瘤块的生长，使实体性肿瘤消退。

肿瘤的免疫治疗在理论上遇到许多困难，其中一个困难是肿瘤专一表面抗原（或称肿瘤专一移植抗原 TSTA） 的抗原专一性是每一肿瘤各不相同的，因此对一种肿瘤有效的抗体对其他肿瘤就可能没有作用。是否能制造对所有或许多种肿瘤细胞都有效的抗肿瘤的疫苗呢？从理论上考虑，既然几乎所有瘤细胞表面都有 WGA 受体，就有可能利用WGA受体，合成对许多肿瘤有效的“人工肿瘤抗原”。最近有人在这方面作了有趣的尝

试（Shier，1971）。已知 WGA 和细胞表面专一受体的结合点是壳双糖，并且从瘤细胞表面分离出来的 WGA 受体已证明是含有 N-乙酰氨基葡萄糖的糖多肽（Burger，1969）。所有已知可溶性糖蛋白中，当 N-乙酰氨基葡萄糖位于糖和多肽连接处时，都是以 β-D-糖苷键和 L-天门冬氨酸的胺基连接。因此，可以假定 WGA 受体的部分结构如下：



模仿这一结构可以将壳二糖和多聚-l-门冬氨酸钠连接，合成“人工肿瘤抗原”：



“A”抗原

用这种“人工肿瘤抗原”免疫小鼠后，对几种不同种类的肿瘤均表现出一定程度的杀伤作用。这一实验还是很初步的，可以说还是“模式实验”。严格说来，应先从肿瘤细胞找到专一的表面抗原决定簇，测定其结构，然后才谈得上模拟合成。然而，这一实验毕竟还是很有启发性的。它说明肿瘤的表面抗原特性，以及许多肿瘤共同的特异的表面抗原的探寻，分离、提纯和结构的研究，是免疫化学家们面临的一个非常引人注目的重要任务。我们将在讨论正常细胞的表面抗原后再回到这一问题。

三、红血球膜上的血型抗原

如 81 页所述，人类红血球膜上含有许多血型抗原，其中 A、B、H 抗原和 Le^a、Le^b 抗原主要是以糖脂形式存在于膜上，而 M、N 抗原是以糖蛋白形式存在于膜上。红血球膜的抗原构造很复杂。除血型抗原外，已经研究过的以糖脂形式存在的，如 Forssman 抗原等，以糖蛋白形式存在的，如植物血球凝集素受体、病毒受体等（表 4-4）。由

表 4-4 人红血球细胞膜上已发现的抗原

系　　统	专一抗血清测定的抗原	化 学 性 质
异嗜性抗原	Forssman	糖脂
物种专一	I	蛋白质(？)
ABO	A_1,B,H	糖脂，糖蛋白
M,N,S,d	M,N,S,s,U,Mg,M,Tm，及其他 16 种	糖蛋白
P	P_1,P^K,Luke	未知
Rh	D,C,c,C^w,C^x,E,e，及其他 13 种	糖脂(？)
Lutherian	Lu^a,Lu^b	糖蛋白(？)
Kell	K,k,Kp^a,Kp^b,Js^a,Js^b	未知
Lewis	Le^a,Le^b	糖脂
Duffy	Fy^a,Fy^b	未知
Kidd	Jk^a,Jk^b	未知
Diego	Di^a,Di^b	未知
Yt	Yt^a,Yt^b	未知
Xg	Xg^a	未知
Dombrock	Do^a	未知

（据 Nowotny，1972)。

于取材方便，红血球细胞膜的抗原结构研究最早，也最广泛，可作为一般细胞的代表。

(一) ABH 和 Le^a、Le^b 系统血型抗原及有关的糖脂

根据 Watkin (1972) 等的研究，人红血球膜上有血型专一性的糖脂，按前体物糖链的不同，分为两个不同的系列。糖链 2 型(乳糖-N-新 4 糖) 系列不能产生 Le^a 和 Le^b 抗原(图 4-15)。

和分泌的血型物质比较，红血球膜上的血型糖脂，其糖链末端几个残基是和血型物质相同的，它们决定血型的专一性，合成它们的基因控制也是相同的 (Watkin，1972)。所不同的是血型糖脂的糖链通过脑脂胺 (Ceramide) 和膜上的疏水结构相连，因而是不溶的；血型物质的糖链则是通过丝氨酸或苏氨酸残基和多肽链相连，因而是可溶的，分泌性的。

新近有人从 A 型红血球膜分离出一个糖脂蛋白，约占膜蛋白总量的 9%，分子量大于 250,000。提纯的这一糖脂蛋白 A 型抗原的比活力比原来的纯细胞膜强九倍 (Davis 和 Bakerman，1972)。很可能血型糖脂是和膜上载体蛋白相连，多糖抗原决定簇露在膜的外表面。利用铁蛋白标记的抗 A 抗体研究，证明抗原存在于膜的外表面的颗粒上。多糖末端酶解后，就失去抗原活力。因此，多糖血型抗原决定簇，可能通过脂质的疏水部分和膜上的固有蛋白结合。总之，ABH 血型抗原载体是以脂蛋白形式参加红血球膜的构造(图 4-16)。不过也有证据表明 ABH 血型抗原还可以糖蛋白形式存在于膜上 (Kościelak，1973)。

最近发现一个新的糖脂前体，可能通过两条互相竞争的代谢支路，一条支路是和糖连接形成 A、B、H 抗原；另一条支路是和唾酸连接，无抗原活性。由于后一支路的存在，在某些白血病的白血球上导致血型抗原的丧失 (Kościelak，1973)。

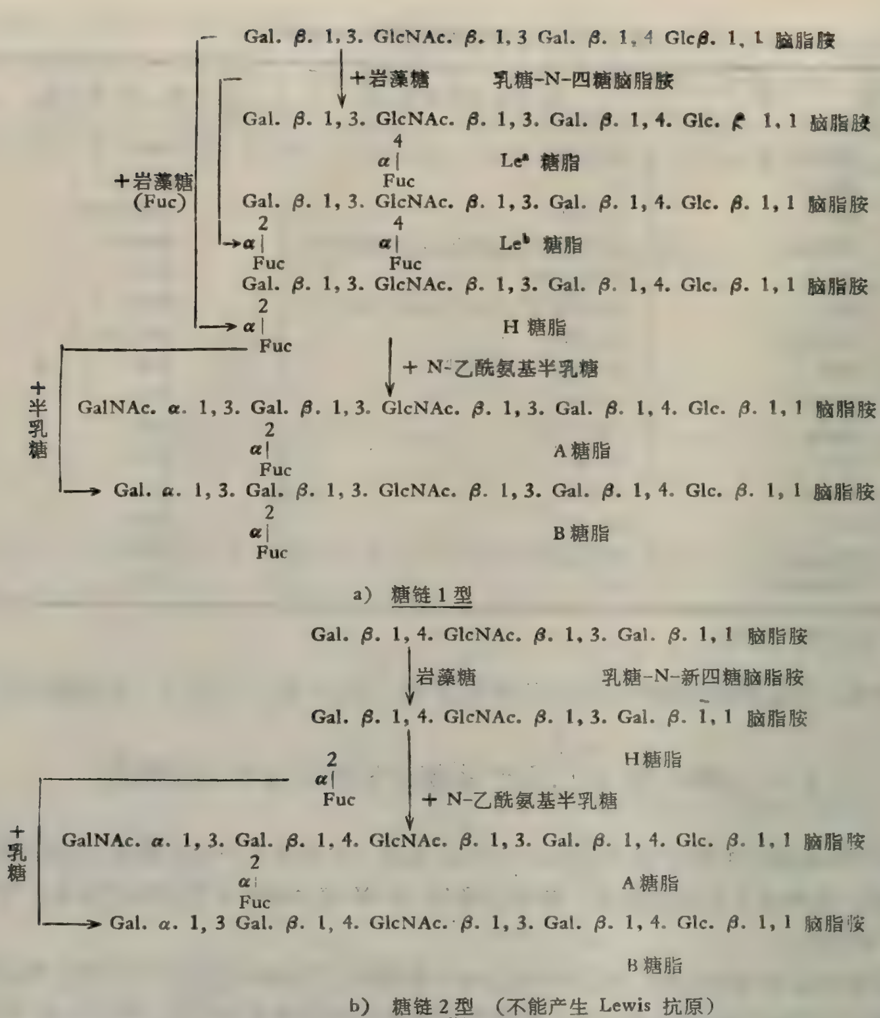


图 4-15 红血球膜 A, B, H, Le^a 和 Le^b 系统的糖脂的结构,按前体物糖链的不同分为两个系列(据 Watkins, 1972)。

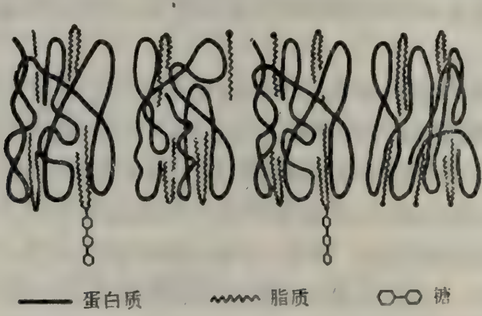


图 4-16 血型抗原载体(脂蛋白)参与红血球膜的构造模型(据 Davis 和 Bakerman, 1972)。

除血型抗原糖脂外，人红血球膜的中性糖脂部分还含有许多糖脂，都含有-Glu-β-1,1-脑脂胺的共同构造，总称为球苷脂（Globsides）。几种重要的球苷脂见图 4-17。著名的异嗜性抗原（Forssman 抗原）的半抗原（见87页）也属于这一类,它同样可能通过

Glc. β. 1.1. 脑脂胺	葡萄糖脑脂胺
Gal. β. 1.4. Glc. β. 1.1. 脑脂胺	细胞脂H
Galα 1.4. Gal. β. 1.4. Glc. β. 1.1 脑脂胺	脑脂胺三糖苷
Gal. NAc. β. 1.3. Gal. α1.4. Gal. β1.4. Glc. β1.1 脑脂胺	球苷脂1(细胞脂 K)
NANAα. 2.3. Gal. β. 1.4. Glc. β1.1. 脑脂胺	血红苷脂
NANA. Gal. Glc. 脑脂胺	神经节苷脂 GM3
GalNAc. Gal. Glc. 脑脂胺 | NANA	神经节苷脂 GM2
Gal. GalNAc. Gal. Glc. 脑脂胺 | NANA	神经节苷脂 GM1

图 4-17 红血球膜的一些糖脂(在其他细胞类型也可能存在)。

脑脂胺和膜上的载体蛋白相连接。

这些糖脂还可能在其他细胞表面存在并在病理过程中发生典型的变化。某些中枢神经系统的遗传性疾病，缺少β-D-N-乙酰己糖胺酶，神经节苷脂GM2 不能降解，结果便积聚在神经原内，成为这种病的典型特征（Okada 和 Brien，1969）。病毒诱发的瘤变过程中，除 GM3 外，链长更长的神经节苷脂的合成受阻（Brady，1973b）。化学诱变时，则略有不同，GM2 占优势。某些肝癌也是低级的神经节苷脂占优势。有人发现正常细胞生长密度增加时，糖脂链长也增加，而在病毒引起瘤变过程中，这种效应就消失了(Hakomori，1970)。伴随糖脂链的缩短，细胞表面的接触抑制也消失了。这表明细胞表面糖脂的变化，也和细胞的行为有一定的关系。总之，这说明瘤细胞生长接触抑制的消失，很可能是细胞表面特性的多方面改变的结果。

（二）M、N 血型抗原及有关的糖蛋白

M、N 系统是发现的第二个人类血型系统，受两个等位基因控制。人红血球经神经氨酸酶处理便失去 M、N 抗原专一性，以及和流感病毒结合的能力；同时释放出 N-乙酰神经氨酸（NANA）。另一方面，遗传上病毒受体和 M，N 抗原受同一基因座控制。这

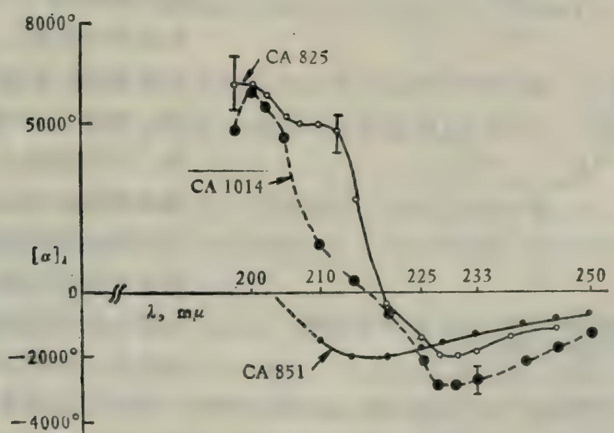


图 4-18 人血型抗原和病毒受体的远紫外旋光色散光谱。（CA825）红血球膜的 NN 血型抗原和病毒受体。（CA1014)红血球膜的 MM 血型抗原和病毒受体。（CA 851）从胎粪分离之 Vg 血型抗原和病毒受体作为无构象秩序性的例子（据 Jirgensons 和 Springer，1968)。

表 4-5 人 O, MM 和 O, NN 血型抗原的离体活力对分子量的依赖

抗原		分子量	完全抑制用四倍凝集剂量引起O型红血球凝集所需的最低量(微克/毫升)*		
			人血清		流感病毒 PR8
			抗-M	抗-N	
MM	Ca 979	12×10^6	1		0.05
	Ca 980	6×10^6	3		0.2
	Ca 1014	1.8×10^6	5		0.8
NN	Ca 825	5.9×10^5		10	1.5
	Ca 745	1.5×10^5		50	
M, N		3.1×10^4	500	3,500	10

* 血型测定用同型、纯合子红血球。

些事实均说明，M,N 血型抗原和流感病毒受体有共同的分子基础。

已知禾草豆（*Vicia graminia*）凝集素有和N血型抗原结合的专一性。M、N 型红血球经神经氨酸酶轻度处理时，去除唾酸，便失去M专一性，同时出现N专一性。这表明N可能是M的前体物。此外，大肠杆菌的 β-半乳糖糖苷酶可破坏N抗原专一性，表明 β-D-半乳糖吡喃糖基可能是和禾草豆凝集素反应的优势抗原决定簇(见表 4-2)。

M、N 血型抗原的化学性质是糖蛋白。随采用的从膜上离解下来的方法的剧烈程度不同，得到的制品的分子量相差很远。用蛋白酶处理，得到的分子量约为 30,000。用较温和的分离方法，得到的分子量约为 150,000 到 12,000,000，这可能接近在膜上存在时的分子大小。血型抗原活力及抗病毒活力和分子量有一定关系，分子量增加，活力也升高（表 4-5）。根据旋光色散，圆二色谱分析，红血球膜 M、N 抗原和病毒受体分子，有16% α-螺旋及广泛的 β 构象。分子量减小，构象的秩序性也减少（图 4-18）。这说明抗原专一性和活性是不同的。前者仅仅和优势决定簇有关系，而后者还受整个抗原大分子的构象的影响（Springer 等，1971，1972）。

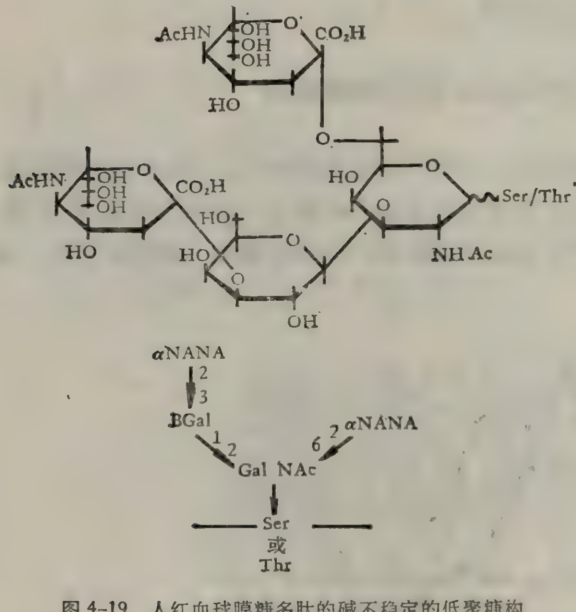
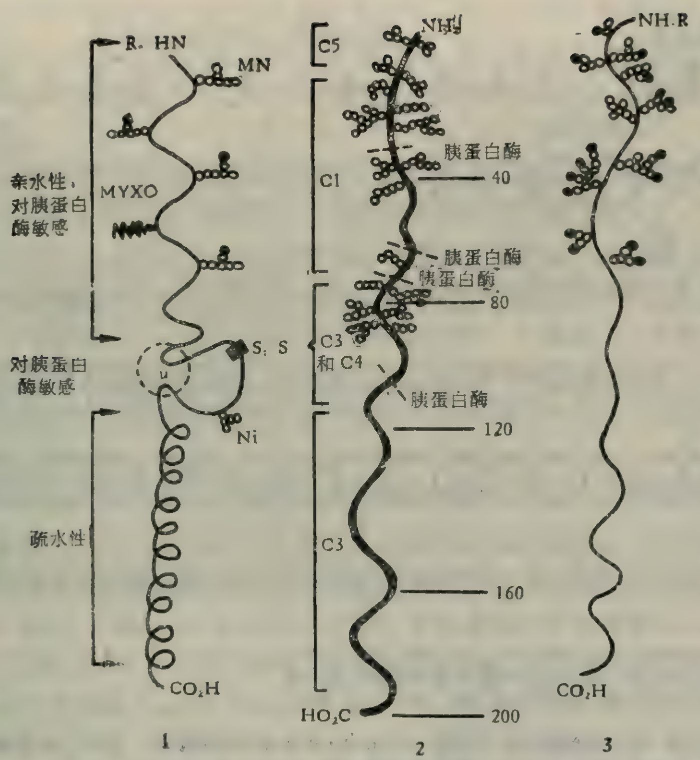


图 4-19 人红血球膜糖多肽的碱不稳定的低聚糖构造（据Winzler, 1972)。

用胰蛋白酶处理 M、N 专一性的红血球膜，释放出水溶性的糖多肽（分子量 ≒1×10^4）。含 80% 多糖，20% 氨基酸；而不溶的细胞膜残渣只含 3% 多糖。和细胞膜原料、残渣比较，可溶性多肽所含的 Ser、Thr 要丰富得多，Asp 也比较多，然而缺少疏水性氨基酸（Winzler, 1972）。因此，假定原来膜上的抗原糖蛋白大分子可能具有不对称的



据 Pardoe & Uhlenbrück (1971)　　据 Marchesi 等 (1972)　　据 Morawieki & Winzler

图 4-20　人红血球膜主要糖蛋白的几种建议构造。(1) Pardoe 和 Uhlenbrück (1971) 模型，依据醣抗原及有关构造的免疫化学定位研究。M、N 血型抗原决定簇更靠近亲水的N端。流感病毒受体 (MYXO) 位于更靠C端的地方。U和S抗原系统位于易被蛋白酶酶解的"连接"区。(●) 代表神经氨酸基团。分子之无抗原性的、疏水的"尾"部呈 α-螺旋构造。(2) Marchesi 等(1972)模型，依据 CNBr 裂解断片的化学分析 (C1—5 断片)。分子的亲水部分标记的地方易于被胰蛋白酶酶解。C端深埋在膜内，N端未被取代。(3) Morawieki(1964) 和 Winzler(1972) 模型，蛋白有亲水的"头"和疏水的"尾"。糖分布在头部，靠近N端(据 Cook 和 Stoddart, 1973)。

构造，糖及其他亲水性残基和疏水性残基各自集中在分子的两端。低聚糖集中在分子的亲水端，位于细胞表面，易于被酶解。疏水端埋在膜内，酶处理时，因而留在膜残渣内，不释放出来。

此可溶性糖多肽经碱处理释放出一个四聚糖，结构如图 4-19 所示。这一低聚糖是 MM、MN、NN 红血球共有的，没有证据说明参与血型抗原决定簇的组成，但可能和病毒结合有关系 (Cook 和 Eylar, 1965)。

根据这些实验事实，Winzler (1972) 提出红血球细胞膜的主要糖蛋白的结构模型 (图 4-20；3)，多糖集中分布在分子的 N 端，形成亲水的头段，露在细胞膜的外表面，易被酶解；而疏水的尾段 (C 端)，深埋在细胞膜内，靠疏水性相互作用，和膜紧密的结合。Marchesi 等 (1972) 用二碘水杨酸锂法，从红血球膜分离出的大分子糖蛋白，经 CNBr 裂解成五个片段。同样发现糖、亲水性残基和疏水性残基不对称的分布，糖和亲水性残基集中在靠 N 端的片段，并且分子的 N 端部分的几处易于被蛋白酶酶解 (图 4-

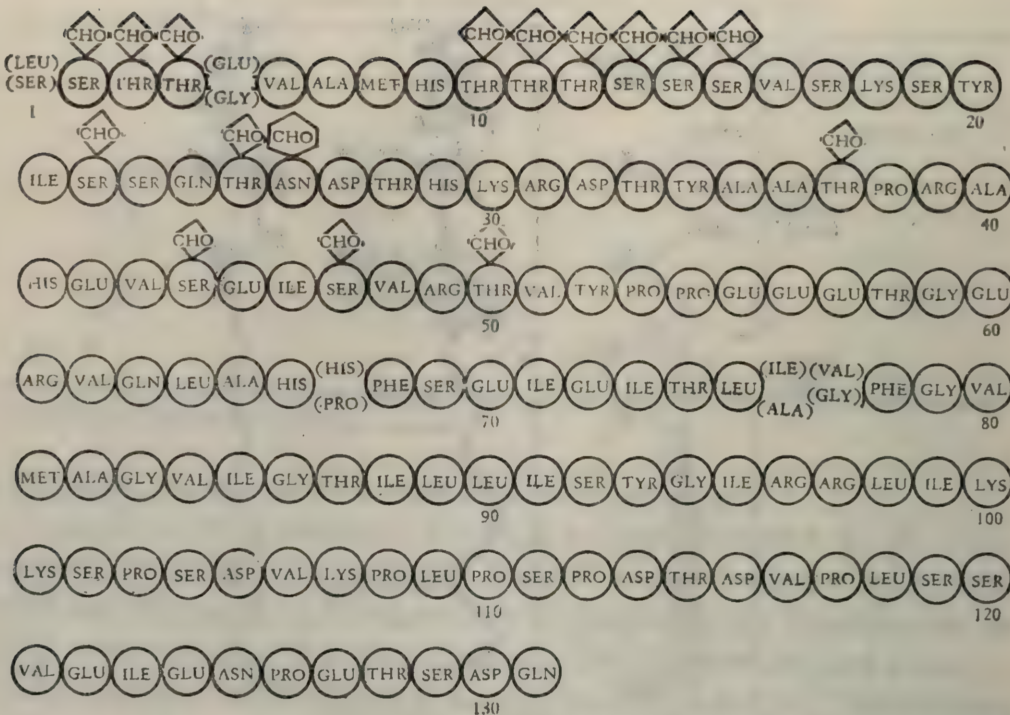


图 4-21 人红血球 MN 血型糖蛋白 (Glycophorin A) 的氨基酸排列顺序。CHO，低聚糖。(◇) O—糖苷键连接；(⬡) N—糖苷键连接 (据 Tomita 和 Marchesi, 1975)。

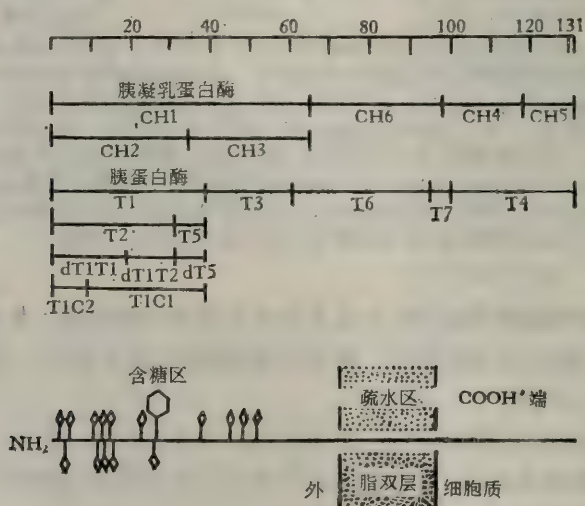


图4-22 人红血球 MN 血型糖蛋白三个性质不同的区段示意图 (据 Tomita 和 Marchesi, 1975)。

20；2）。Pardoe 等（1971）根据多糖抗原及有关构造的免疫化学定位方法，证明 M、N 血型抗原靠近糖蛋白大分子的亲水的 N 端，而分子疏水的“尾部”，呈 α-螺旋构造，没有抗原性(图 4-20；1)。从图 4-20 可见，用三种不同的方法得出糖蛋白分子构造模型是大体上相似的，这表明它可能反映真实的构造。根据这一模型，可以解释 M、N 系统，以及某些罕见的血型亚型的复杂情况，可以假定 M、N 抗原决定簇位于多肽链的亲水性

N 端，某些罕见的亚型（如 M^k）的决定簇也可能位于同一区域，流感病毒受体可能位于更靠近 C 端的地方，不过仍然处于易被酶解的区域。U 和 S 抗原系统可能存在于分子亲水部分和疏水部分的"连接区"，仍然对蛋白酶敏感的区域。抗原 U 可能包括多肽链 α-螺旋区的开头部分，而在罕见的"u"型个体，S,s 决定簇的侧链"倒转"，不再位于最上端的位置。分子尾部的 α-螺旋构造的大部分，虽然本身和抗原专一性没有关系，但可能和维持整个分子的构象有关系，因而也可能间接地影响抗原活力的大小。

现在已经把 MN 血型抗原从人红血球膜上分离出来，定名为血型糖蛋白 A (glycophorin A)，并且测定了全部一级结构（图 4-21）(Tomita 和 Marchesi，1975)。血型糖蛋白 A 是一个唾酸糖蛋白，分子量为 31,000 道尔顿。它是由 131 个氨基酸残基组成的一条单链，含有 16 个低聚糖残基，糖链部分约占分子总体积的 60%。分子一级结构的主要特点是所有的低聚糖链都集中在靠 N 端的一段肽链上，而 C 端则有很多酸性氨基酸形成团簇状，可能易于和阳离子（如 Ca^{++} 等）或碱性多肽结合。多肽链的中段（从 73 到 92 残基）约包括 20 个非极性氨基酸，大部分为疏水性的。血型糖蛋白 A 的一级结构的这些特点提示，分子的两端可能分布在细胞膜两侧的表面上，与亲水基团相互作用；中间一段肽链则可能横贯膜的脂双分子层（图 4-22）。这和图 4-20 的分子模型是完全符合一致的。最近，还进一步发现 M，N 两个等位基因决定血型糖蛋白 A 氨基酸排列顺序上两个位置的差异。血型糖蛋白 A^M 在 1 和 5 的位置为 Ser 和 Gly，而血型糖蛋白 A^N 的相应位置则被 Leu 和 Glu 所代替。这一事实可以解释图 4-21 中 1 和 5 位置氨基酸残基的不均一性 (Furthmayr，1978)。最后，还需要指出，血型糖蛋白 A 上的寡聚糖链和红血球膜 MN 抗原性有关。但是，当低聚糖从膜上分离下来后，就不能表现 MN 抗原性，说明抗原性还依赖多肽链上的氨基酸残基参加。

对于 Rh 抗原的了解，比 MN 系统还要少得多。近来才有人用脱氧胆酸把 Rh(D) 抗原从人红血球膜上溶解下来。这样初步分离的膜蛋白重聚成小泡时，仍表现出专一的 Rh 抗原活力 (Lorusso 和 Green，1975)。

（三）红血球膜上抗原的空间分布

血型抗原在膜上的空间分布，对于了解细胞膜的结构是很重要的。应用电子显微镜冰冻蚀刻技术 (Freeze-etching Technique)，可以直接观察膜的外表面以及膜的内部的大分子结构。标本先经深低温处理，使疏水键大大减弱，因而切片时裂面总是沿脂双层疏水区中间劈开，把细胞膜撕成两层，露出疏水的裂面（图 4-23，上）。膜的天然外表面可通过蚀刻步骤，使冰升华而显露出来（图 4-23，下）。然后再经过金属投影、制成铂摹本等手续，便可供电子显微镜观察。经过冰冻蚀刻处理，人正常红血球（A_1 型）膜的裂面上可观察到约 85 Å 大小的球形颗粒，在膜上均匀的分布。这些球形颗粒显然是埋在膜内的。如果细胞膜经过蒸馏水处理，这些球形颗粒便簇集成团，裂面 (F) 上便清楚地区分出光滑区和颗粒区，而在蚀刻面 (E) 上则呈现粗糙区（图 4-24，a）。用铁蛋白标记的抗 A 抗体，能专一地和蚀刻面上的这些球形颗粒结合，证明它们就是 A 抗原所在的位置（图 4-24，b,c）。根据其他方法估计，A_1 红血球的抗原位点的数目约为 $8—11\times10^5$，直接观测到的膜上颗粒数目约为 6.2×10^5（或 4,200 /μm^2 膜面积），两者大体上是符合的

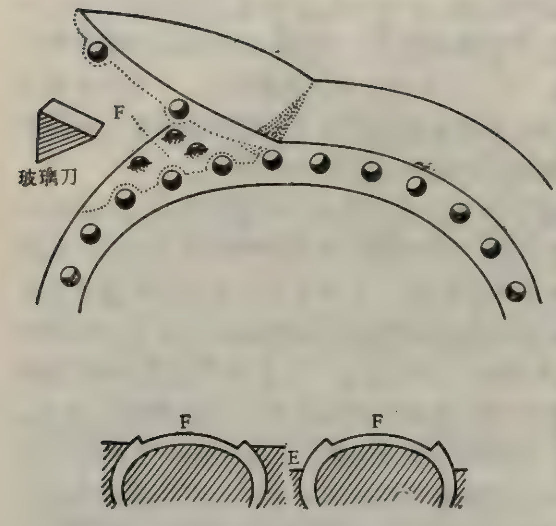


图 4-23　冰冻蚀刻步骤。上图示经深低温处理的细胞膜，切片时被撕成两层。原来埋在膜内的球形颗粒在裂面（F）上部分露出。下图示进一步使冰晶升华，冰层降低露出粗糙的"刻蚀"表面（E）（据 Marchesi 等，1971；da Silva，1971）。

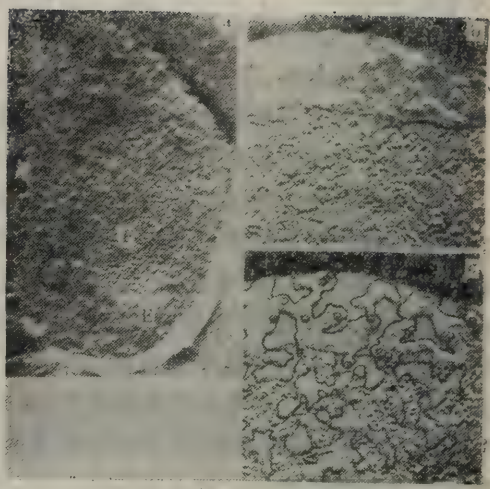


图 4-24　冰冻蚀刻的人 A_1 型红血球膜，用铁蛋白抗体结合物直接标记A抗原位点（a×75,000，b、c×130,000）。裂面（F）和蚀刻面之间为嵴隔开。在裂面可见膜上颗粒簇（箭头），而在蚀刻面上这些颗粒突出，呈粗糙区（C中，线条范围内区域）。蚀刻面粗糙区的轮廓是和裂面上颗粒簇沟通的。标记抗体上的铁蛋白分子（圆圈），亦即A抗原位点，是和蚀刻面上突起的膜颗粒结合的（da Silva 等，1971）。

(da Silva 等，1971；Howe 和 Bächi，1973)。用免疫电子显微镜技术，观察到红血球分化、成熟过程中，细胞表面血型抗原的密度逐渐增加。这也许可以解释年青的和成熟的红血球，对免疫溶血的敏感度为何不同的缘故（Skatelsky 等，1974；Reyes，1974）。

用铁蛋白标记的植物血球凝集素（PHA-F）和流感病毒（FLU），显示其受体（已知为糖蛋白）在红血球膜内的分布，同样证明各种受体是和膜内颗粒的分布一致的。当红血球膜经过胰蛋白酶处理后，膜内颗粒便簇集成网状，用 PHA-F 显示 PHA 受体的分布也相应地呈网状(图 4-25；4-26)（Marchesi 等，1971）。流感病毒（FLU）能和同一糖蛋白分子的唾酸残基结合。病毒和膜结合时，结合的地方凹陷下去，结果裂面上便留下一个"印迹"。根据这个"印迹"就可以确定病毒原来在膜上结合的位置。当用流感病毒处理经过胰酶作用的红血球膜时，病毒在膜上的"印迹"，只留在有球形颗粒簇集的地方。这也就是说病毒只和这些簇集的颗粒部位结合(图 4-27)。因此，可以做出结论，各种 PHA 和病毒受体也是和这些膜内颗粒相联系的。这些球形颗粒也应含有糖蛋白。

综合用电子显微镜和化学方法，对血型抗原、PHA 和病毒受体的研究结果时，可以作出结论，这些糖蛋白或糖脂蛋白是和膜内球形颗粒有密切关系的。根据这些实验结果，可以设想红血球的这些主要表面抗原是散布在膜内的球形的糖蛋白或糖脂蛋白大分子上的。这些分子具有不对称的构造，分子的主要抗原决定簇，集中在多肽链亲水性的 N 端，露出在膜的外表面，因而易和抗体、PHA 或病毒结合并被酶解。分子的疏水部分，存在 α-螺旋构象(和 β-构象?)，形成球形构造，通过疏水性相互作用和膜牢固的结合，埋在脂双层内。冰冻蚀刻时，膜裂成两层，因而部分地暴露出来(图 4-28)。或许还可以设想，

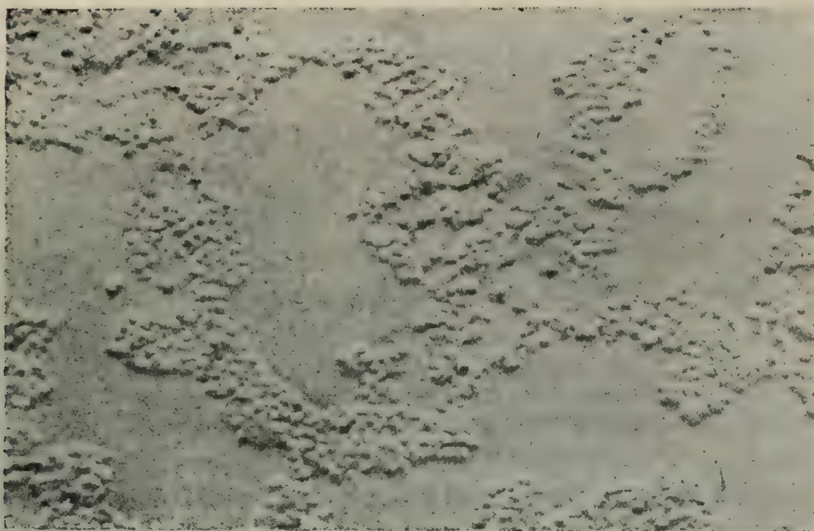


图 4-25 胰蛋白酶处理过的人红血球膜表面铁蛋白标记的植物血球血凝素 (PHA-F) 的定位，PHA 受体呈现网状分布(×150,000)(据 Marchesi 等,1971)。

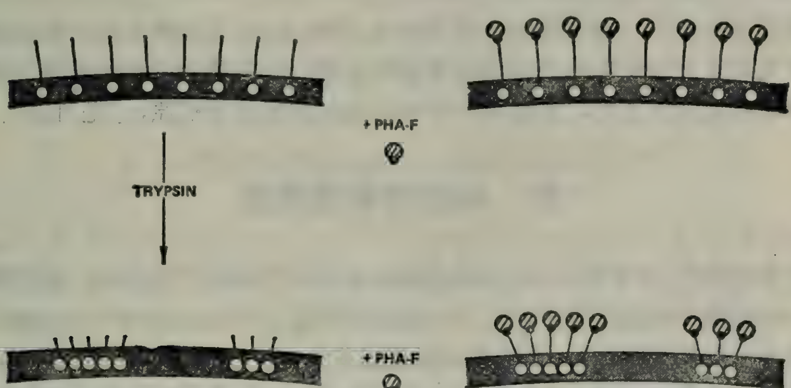


图 4-26 红血球膜 PHA 受体的定位。带有 PHA 受体的糖蛋白外露在细胞外表面，并和膜内颗粒连接(据 Marchesi 等,1971)。

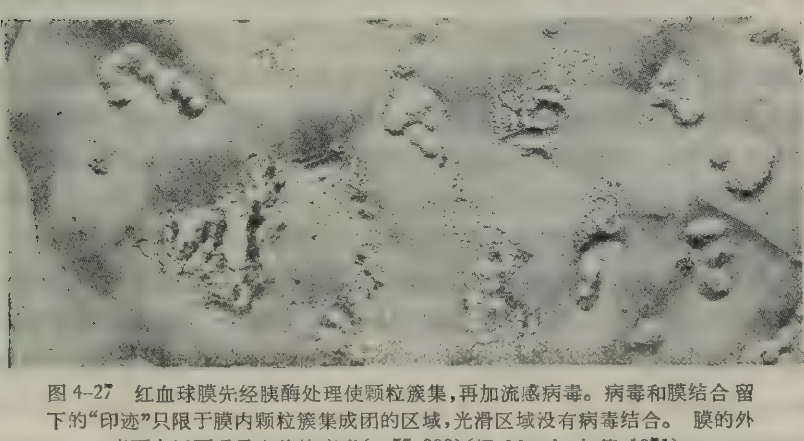


图 4-27 红血球膜先经胰酶处理使颗粒簇集，再加流感病毒。病毒和膜结合留下的"印迹"只限于膜内颗粒簇集成团的区域，光滑区域没有病毒结合。膜的外表面上还可看见完整的病毒(×55,000)(据 Marchesi 等,1971)。

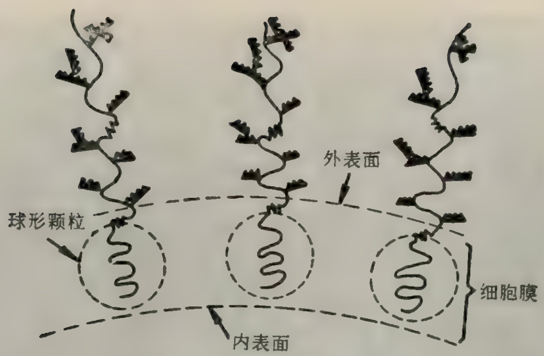


图 4-28 血型抗原及 PHA 受体在红血球膜上的构造示意图。糖蛋白的亲水部分露在外表面，能和标记抗体结合。埋于膜内的球形颗粒相当于分子的疏水部分，在冰冻蚀刻的裂面上部分地暴露出来（据 Marchesi, 1971）。

膜上的每一个球形颗粒（70—80 Å）连同其亲水性的糖多肽链，构成一个天然的“抗原结构单位”，它们还可能担负着目前还未知的其他功能。由于“抗原结构单位”的各组成部分和细胞膜结合的牢固程度以及所处的空间位置不同，用不同的方法分离、提取时，这些组成部分便不同程度地从膜上“溶解”下来。因此，得到一系列分子量大小不同的抗原制品。低渗液或酶处理时，球形颗粒在膜上移动，簇集成团，说明膜结构的动态性质。总之，所有这些事实都是和细胞膜的流动镶嵌模型相容的。从这些结论得出的关于细胞表面抗原结构的概念以及研究方法，或许对于研究其他细胞的表面抗原，也是可以引为借鉴的。

四、组织相容性抗原

组织相容性抗原，或移植抗原，是决定细胞生物学个性的主要标记。由于这些抗原的存在，同一物种某个体的组织移植到另一在抗原组成上不相容的个体时，就会引起免疫反应，导致移植物加速排斥。和这些抗原形成有关的许多基因，称为组织相容性基因。它们在染色体上的位点，称为组织相容性基因座（简称 H-基因座），每一基因座上又有一系列等位基因。组织相容性等位基因是共显性的，基因的最后产物在杂合子细胞中能各自显现出来，表现出各样的同种异体抗原专一性。因此，同一物种不同个体之间组织相容性抗原的组成，呈现极其纷繁复杂的多型现象。不同的 H-基因座产生的抗原，强弱不同，移植免疫反应主要是由主基因座决定的。小鼠的主基因座是 H-2 系统，包括至少 20 个不同的等位基因，决定红血球、白血球、血小板和其他器官、组织的抗原性。人类的主基因座是 HLA 系统*，包括 30 个以上不同的等位基因，决定除红血球以外的各种器官、组织的抗原性。通常是以白血球的抗原性作为代表。HLA 和 H-2 系统是移植免疫中最重要的抗原系统，也是研究得最多的系统（Billingham 和 Silvers, 1971）。

HLA 抗原系统对于临床医学上的重要性是显而易见的。虽然用血清学方法已经区别出 21 种抗原专一性，它们在化学上的鉴别仍然进展很慢。这主要是由于抗原和细胞膜结合牢固，从膜上溶解和纯化很困难。其次，很难得到遗传上均一的大量材料，也是

* 根据 WHO 新的命名原则，1976 年后文献中HL-A 改称为 HLA。

一个重要的限制。近年来由于纯系淋巴球大量培养成功，能供应足够的遗传性均一的材料，以及细胞表面抗原的分离、纯化技术的进步，移植抗原的化学性质的研究才打开了局面。

人类 HLA 和小鼠 H-2 移植抗原都是存在于细胞膜上的糖蛋白。在完整的细胞膜上，很可能多肽和糖都和抗原活性有关系，不过不同作者对它们的相对重要性，仍有不同的看法。这些分子在细胞表面的排列还不太清楚，据推测很可能和其他抗原（血型抗原、其他系统的同种异体抗原），紧密靠近，交错地镶嵌排列（Boyse 等，1968）。据标记杂交抗体法，对小鼠淋巴球表面电子显微镜连续切片观察和重组的模型看来，H-2 抗原在细胞表面是不连续地，大小不等地成片分布的（Old 和 Boyse，1973）（图 4-29）。

从细胞膜上分离可溶性移植抗原的方法，主要有几类：1）表面活性剂处理，如非离子型的表面活性剂 NP-40，Triton X-100，Brijgg 等；2）酶解，用木瓜酶处理，从膜上释放出有抗原性的糖多肽断片；3）低频声波击碎；4）3*M*KCl 提取。用不同方法得到的抗原制品的分子量和化学组成都有很大不同。用表面活性剂"溶解"的糖蛋白容易形成大分子聚集物，分子量达到 200,000—380,000；用其他几种方法分离的分子量较小，约在 35,000—55,000 之间。木瓜酶酶解的为糖蛋白（含有 3—8% 多糖），而 3*M*KCl 提取和声波处理的都几乎不含糖（<1% 多糖）。这些差别很可能是膜的"抗原结构单位"在用不同方法提取时，发生不同程度的解离，以及多糖和载体蛋白分子分离的结果。这一点对于分析不同研究者用不同方法得到的结果时，是很重要的。

（一）移植抗原的分离、纯化和化学性质

Reisfeld 和 Kahn（1970—72）从大量培养的人纯系（同基因型）淋巴球的细胞膜，3*M*KCl 提取的可溶部分，经聚丙烯酰胺凝胶制备电泳，一次分离，得到的迁移率 Rf = 0.78—0.80 的部分，表现 HLA 抗原活力（图 4-30）。这一成分再经分析凝胶电泳鉴定为一个均一的成分，Rf 仍保持 0.78，分子量为 32,000（图 4-31）。此外，用低频声波法得到的可溶性抗原，分子量为 34,600。电泳迁移率、氨基酸组成也都和前一方法纯化的抗原成分相同。这表明用两种方法分离的抗原成分可能代表原来细胞膜上的同一分子构造。

移植抗原的专一性主要是由糖蛋白的多肽部分还是多糖部分决定的，这是曾经长期争论的问题（Sanderson 等，1971；Nathenson，1970；Nossal，1972）。对上述纯化的抗原成分的化学性质研究的结果表明，抗原决定簇主要位于多肽链上，结构还不清楚。这主要有以下几方面的证据：首先，纯化的移植抗原成分是分子量约 32,000 的一条多肽链（具有 2 个分子内二硫桥），几乎不含糖（<1%）。蛋白酶处理、变性都能破坏其抗原性。其次，从组织相合性抗原不同的动物品系，或 HLA 表型不同的淋巴细胞株，纯化的移植抗原，其氨基酸组成和酶解肽段图谱，都有明显的可重复的区别。在这些有不同的同种异体抗原专一性的蛋白质的酶解图谱上，24 个肽段中，大多数是相同的，只有 6 个肽段不同。这有力地表明移植抗原遗传上分离的同种异体专一性是和蛋白质构造有关的，不同的 HLA 等位基因直接控制不同肽链的合成（Reisfeld 和 Kahn，1972）。遗传学分析也支持组织相容性基因座是控制多肽链的结构顺序，而不是如 ABO 血型系统

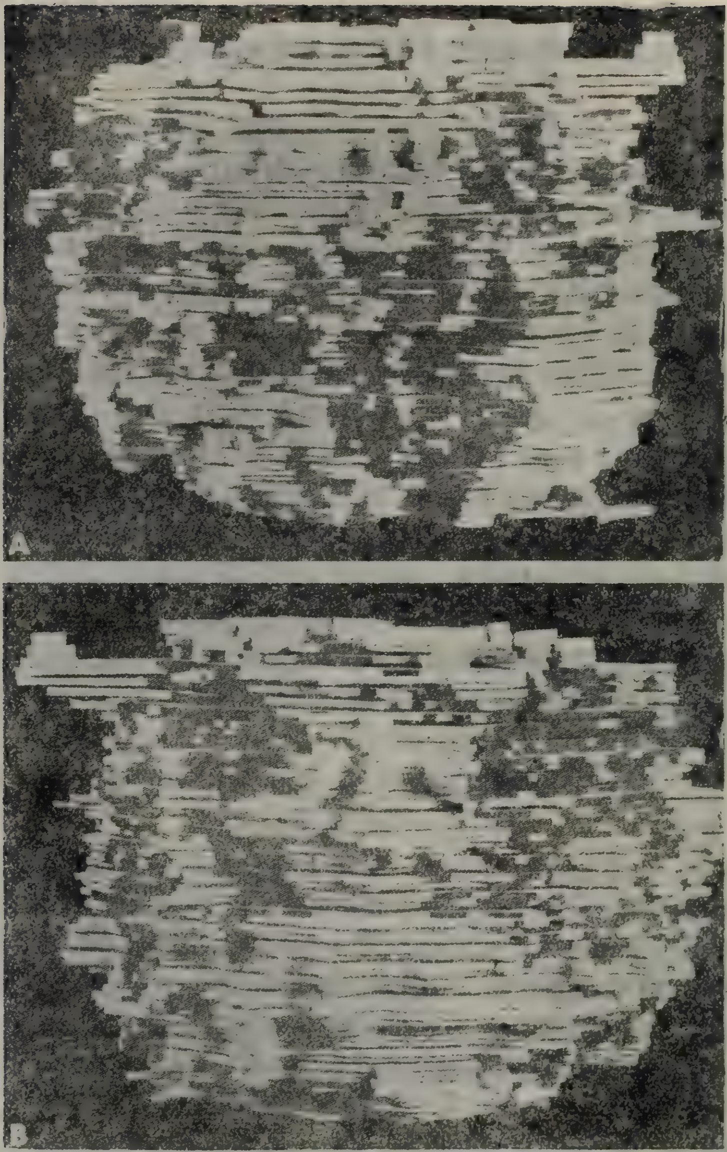


图 4-29 据标记杂交抗体免疫电子显微镜法，显示的淋巴球表面 H-2 抗原的分布。根据同一淋巴球连续切片重组的模型的两面观(据Old 和 Boyse,1973)。

那样控制低聚糖链末端的几个糖残基的顺序。这和免疫球蛋白有些相似（Ceppellini, 1971)。另一方面，对小鼠 H-2 同种异体抗原多糖部分的研究表明，不同 H-2 表型（如 $H\text{-}2^b$，$H\text{-}2^d$）的抗原含有的多糖部分几乎有相同的构造（图 4-32)。因此，多糖部分不直接决定 H-2 抗原的专一性（Nathenson 和 Muramatsu，1971)。

对小鼠 H-2 基因座精细构造的遗传分析证明，存在两个亚基因座，称为 H-2K 和 H-2D。由于这两个紧密连锁的基因是共显性的，每一个细胞在表型上可能表现出 4 种主要 H-2 抗原专一性。此共显性系统充分表现时全部抗原专一性的一半，即相当于一条染色体的基因决定的抗原专一性，称为单元型（Haplotype)。如 H-2 基因座为纯合子的

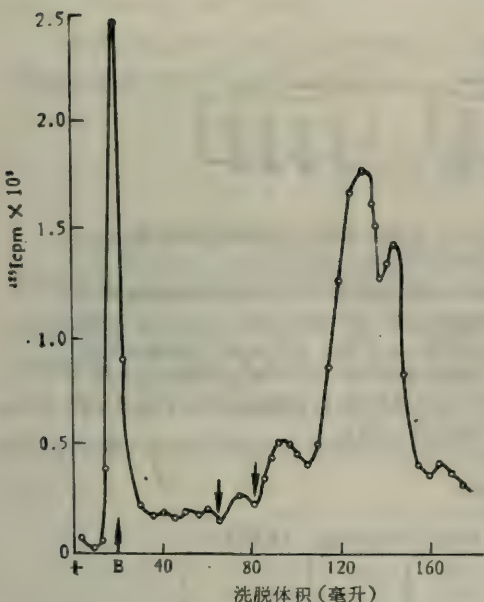


图 4-30　HL-A 抗原（RPMI1788；100mg）的 KCl 提取液经丙烯酰胺凝胶制备电泳的洗脱图形。箭头指示有抗原活性的区域（Reisfeld 和 Pellegrino, 1972）。



图 4-31　HL-A 抗原的电泳图形。(a)丙烯酰胺制备电泳前的 KCl 提取液。(b)制备电泳分离的抗原成分（Reisfeld 和Pellegrino,1972）。

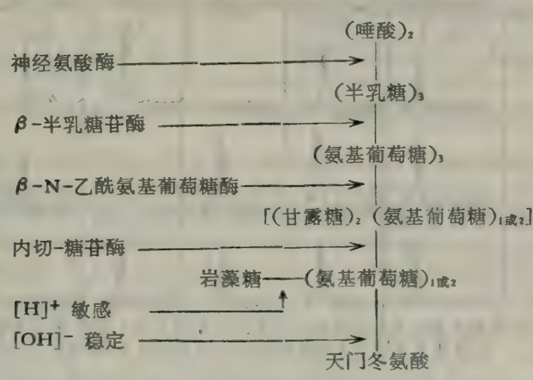


图 4-32　H-2 糖多肽构造假设的模型。图右示假想的结构，图左示测定这些结构所采用的酶或化学处理（据Nathenson 和 Muramatsu, 1971）。

两个小鼠品系（$H-2^a/H-2^a$ 和 $H-2^b/H-2^b$），它们各自的单元型 $H-2^a$ 决定的抗原专一性为 11,4，$H-2^b$ 决定的专一性为 33,2。杂合子品系（$H-2^a/H-2^b$）含有来自双亲的两种单元型，$H-2^a$ 和 $H-2^b$，因此表现 4 种抗原专一性，即 11,4,33 和 2（图 4-33 A）。人类的 HLA 基因座也具有同样的构造。同一基因型的杂合子细胞的四种主要移植抗原专一性是否分别位于不同的抗原分子上呢？对于这一问题，可以把 H-2 基因座为纯合子（$H-2^a/H-2^a$，$H-2^b/H-2^b$）或杂合子（$H-2^a/H-2^b$）细胞的 H-2 抗原从细胞膜上溶解

A. 基因水平

纯合子：H-2^a/H-2^a　杂合子：H-2^a/H-2^b　纯合子 H-2^b/H-2^b

	H-2K	H-2D		H-2K	H-2D		H-2K	H-2D
H-2^a	11	4	H-2^a	11	4	H-2^b	33	2
H-2^a	11	4	H-2^b	33	2	H-2^b	33	2

B. 细胞水平(细胞膜)

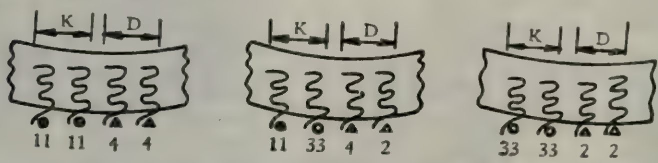


图 4-33　H-2 系统之分子遗传学关系，抗原用 NP-40 从膜上溶解并用免疫沉淀法鉴定。
(A) 基因水平：两个纯合子品系 (H-2^a/H-2^a, H-2^b/H-2^b) 及其杂合子品系 (H-2^a/H-2^b) 的单元型 (Haplotype)。每一个单元型的 H-2K 和 H-2D 基因的下方只列出该基因决定的主要抗原专一性，如 H-2^a/H-2^a, H-2K^a 基因的专一性为 11，H-2D^a 的专一性为 4。(B) 细胞水平(细胞膜简图)：具有主要专一性抗原决定簇的多肽用～～表示。对于纯合子细胞至少可以分离出两种同种异型抗原。如 H-2^a/H-2^a 细胞，能测出对专一性 11、4 反应的糖蛋白分子。H-2^a/H-2^b 杂合子细胞至少有四种抗原分子，每一种分子只具有 H-2 的四种专一性 (11, 33, 4 或 2)中的一种专一性 (Cullen 等,1972)。

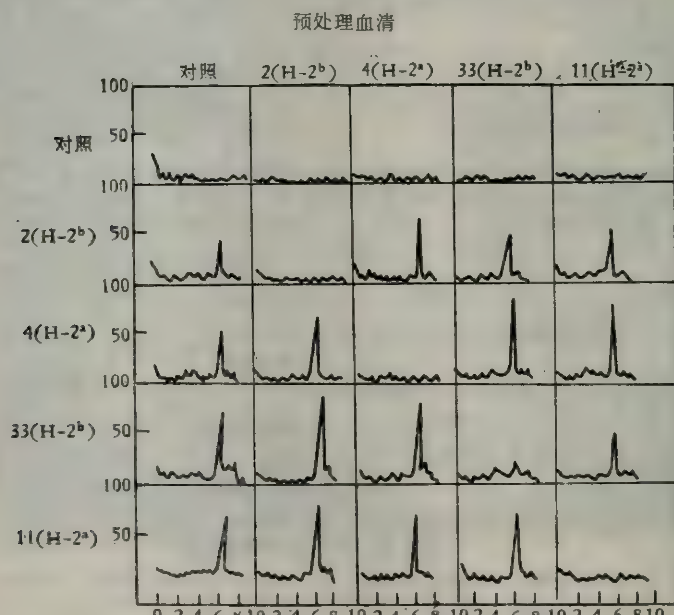


图 4-34　NP-40 从膜上溶解的抗原经免疫沉淀法分析鉴定。^{3}H 标记的抗原提取液先用单专一性抗血清(图上方)预处理，去除产生的沉淀，剩下的上清液和测试抗血清(图左)产生的沉淀的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图形。^{3}H- 岩藻糖标记的抗原的放射强度 (cpm) 用纵坐标表示。预处理血清完全去除某一抗原后，再用测试血清检测时就缺少一个专一的 H-2 抗原峰。除此以外还剩下 3 个专一的 H-2 抗原峰证明还存在 3 个基因产物。因此，四种抗原专一性存在于 4 个不同的分子上(据 Cullen 等,1972)。

下来，并用间接免疫沉淀法和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，逐个加以分离、鉴定 (图 4-34)。从图 4-32 B 总结的结果可见对于 H-2D 和 H-2K 基因为纯合子的小鼠脾脏细胞，至少存在 2 种不同专一性的抗原分子，而对于 H-2D 和 H-2K 杂合子细胞，则至少存在

四种不同专一性的抗原分子。这一发现说明杂合子细胞内，基因共显性表现的分子基础是 4 种 H-2 抗原专一性分别表现在四种不同的分子上（Cullen 等，1972）。对于人类 HLA 系统，同样证明为不同的等位基因决定的专一性各自独立地表现在不同的抗原分子上（Thieme 等，1974）。

此外，用同样方法还证明大鼠淋巴细胞的物种专一抗原和主要移植抗原（Ag-B）位于细胞膜的不同分子上（Callahan 等，1974）。

（二）HLA 和 H-2 抗原的亚基结构

Pressman 和 Cresswell 实验室同时发现，人淋巴球细胞膜经木瓜酶处理，溶解下来的 HLA 抗原（分子量 = 48,000）是由以非共价键结合的两条肽链组成的。分子量较大的肽链（30,000—31,000）是一个糖蛋白，载有各种同种异体的抗原专一性。分子量小的肽链（11,000）是所有 HLA 同种异体抗原共有的，但没有 HLA 抗原活力（Tanigaki 等，1973；Cresswell 等，1973）。进一步研究发现，这一“共同肽链”的氨基酸组成、分子量、电泳迁移率以及免疫学性质都和 β-2-微球蛋白相同（Nakamuro 等，1973；

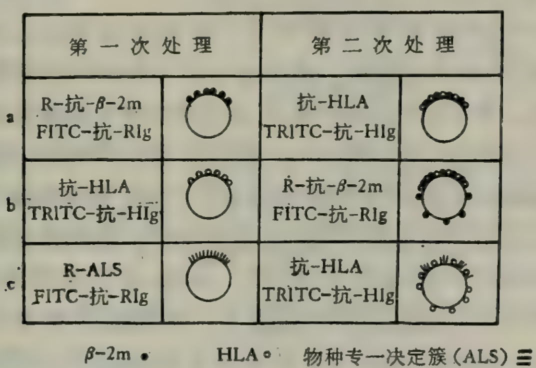


图 4-35 细胞膜抗原移动聚集形成“极冠”。淋巴球先用第一组抗体在室温处理，然后在 37℃ 保温 30 分钟，诱发膜抗原移动，形成“极冠”。细胞在 4℃再用第二套抗体处理，判定第二套抗体显示的抗原决定簇是否和第一套抗体显示的抗原一起移动，并形成“极冠”。(a) 绿色萤光(●)和红色萤光(○)在细胞的一极混融，表明 β-2-m 和 HLA 在一起移动。(b) 绿色萤光(●)和红色萤光(○)在细胞一极混融，但其余地区仍有绿色萤光，这也许是由于有过剩的 β-2-m 留在膜上。(c) 绿色萤光(|||)集中在一极，而红色萤光(○)弥散分布，表明 ALS 抗原和 HLA 抗原不一起移动。R-抗-β-2m：家兔抗人 β-2-微球蛋白；R-ALS：家兔抗人淋巴球血清；抗-HLA：混合的多专一性的抗-HLA；FITC-抗-RIg：萤光标记猪抗家兔免疫球蛋白；TRITC-抗-HIg：Rhodamine 标记山羊抗人免疫球蛋白(据 Solheim 和 Thorsby，1974)。

Cresswell 等，1974；Peterson 等，1974）。已知 β-2-微球蛋白是细胞膜的固有成分，同时也在体液内存在。于是便产生了一个问题，这种复合分子是在从膜上溶解下来的过程中，人为地络合在一起的还是细胞膜上天然存在的亚基构造。

这个问题可以用抗体空间重叠阻遏（Overlapping Blocking）方法，对两个亚基在细胞膜上的位置关系进行分析。如果有 HLA 专一性的蛋白和 β-2-微球蛋白在细胞膜上确是组成同一个分子的两个亚基的话，当其中一个亚基与其专一抗体结合时就可能在空间上阻碍另一个亚基与其专一的抗体结合。从表 4-6 的结果可见，用抗 β-2-微球蛋

表 4-6 Fab' 片段预处理对抗 β-2-微球蛋白和抗 HLA 抗体淋巴球杀伤作用的影响*

Fab' 专一性**	抗体专一性	细胞毒性作用%***
——	β-2-M	>75
β-2-微球蛋白	β-2-M	<15
免疫球蛋白轻链	β-2-M	>75
——	HL A-1	>75
HLA-1	HL A-1	<15
——	HL A-8	>75
HLA-8	HL A-8	<15
HLA-1	HL A-8	>75
β-2-M	HL A-1	<15
免疫球蛋白轻链	HL A-1	>75
β-2-M	HL A-8	<15
免疫球蛋白轻链	HL A-8	>75
HLA-1	β-2-M	>50
HLA-8	β-2-M	>50
HLA-1,8	β-2-M	>25

* 细胞在 Eagle 维持培养液中 37℃ 保温 45 分钟。

** 靶细胞取自 HLA-1 和 HLA-8 专一性为纯合子的人体。

*** 细胞毒性作用程度用台盼蓝染色细胞的百分率表示(据 Östberg 等, 1974)。

白抗体的 Fab'断片预先处理淋巴细胞，就能完全地和专一地抑制各种抗 HLA 抗体的细胞毒性作用。同样地，HLA-1抗或HLA-8 抗体的 Fab' 能略微地抑制抗 β-2-微球蛋白抗体的毒性作用，而 HLA-1抗和HLA-8 抗体的 Fab' 同时使用时就能产生显著的抑制效应。因此，β-2-微球蛋白和具有同种异体抗原专一性的较大的肽链在细胞膜上的位置是紧密靠近的。另一方面，用萤光标记抗体示踪的方法，还观察到抗 β-2-微球蛋白抗体和 HLA 抗体在细胞表面一同移动形成“极冠”。因此，β-2-微球蛋白和 HLA 抗原成分不但紧密靠近，而且作为一个相连的整体在膜上一块移动(图 4-35)(Östberg 等,1974; Solheim 和 Thorsby, 1974)。对于小鼠 H-2 同种异体抗原，得到同样的结果，也发现类似人类 β-2-微球蛋白的亚基存在 (Rask 等, 1974)。因此，β-2-微球蛋白无论在可溶性抗原分子或完整的细胞膜上都可能参与 HLA 或 H-2 同种异体抗原的亚基构造。

进一步的研究还发现 β-2-微球蛋白和淋巴细胞的抗原受体有密切关系。专一的抗 β-2-微球蛋白的抗血清能够抑制同种异体抗原或 PHA 引起的淋巴细胞转化反应。已知这种反应是 T 淋巴细胞表面受体受到刺激引起的。此外，抗 HLA 血清也有同样的作用。这些实验表明 HLA 抗原的亚基和 T 淋巴球的抗原受体在空间位置上或功能上是有紧密联系的 (Poulik 等, 1973; Lightbody 等, 1974; Solheim 和 Thorsby, 1974)。

β-2-微球蛋白参与 HLA 抗原的亚基结构以及它和 T 淋巴球受体的密切关系的发现有着重要的理论意义。已知 β-2-微球蛋白的一级结构和免疫球蛋白重链与轻链的不变区有广泛的同源性 (Peterson 等, 1972; Smithes 和 Poulik, 1972 Cunningham, 1974)。最近还证明 β-2-微球蛋白具有抗体的发效器功能 (Painter 等, 1974)。这些事实似乎提示移植抗原的一个亚基成分和免疫球蛋白可能在进化上有共同的起源。并且移植抗原和 T 细胞的抗原识别受体可能有密切的关系。这种相互关系对于了解 HLA 抗原的功能意义或许会有所启示。

至于组织相容性抗原在细胞膜上的存在形式，目前还不完全清楚。但根据破坏共价键(酶解)或非共价键提取方法释放的产物的分子量和组成的不同，可以得到一些线索。用非离子型表面活性剂(如 NP-40，Brijgg 等)，从血小板、淋巴球膜上分离下来的 H-抗原成分容易形成大分子量聚集物，分子量达到 200,000—380,000 (Dautigny 等,1973; Schwartz 等，1973)。H-2 聚集物可能解离为分子量 43,000—47,000 的单体或“双体”(2×43,000) (Schwartz 等，1973)。用 Brijgg 溶解的 HLA 抗原是由 44,000 和 12,000 两个亚基组成。大的亚基经木瓜酶处理得到一个分子量为 34,000 的糖蛋白，这和用木瓜酶直接从膜上溶解下来的抗原成分是相等的 (Springer 等，1974)。此外，木瓜酶酶解得到的 H-2 抗原成分在 3*M* KCl 溶液中层析时，又可以解离成分子量约 40,000 和 11,000 的两个亚成分，后者可能相当于 β-2-微球蛋白 (Rask 等，1974)。由此可见，木瓜酶和 3*M* KCl处理从细胞膜上释放的抗原成分可能都是分离过程中产生的降解断片，它们的含糖量的显著不同 (前者为糖蛋白，后者几乎不含糖) 以及分子量的差别，可能是由于从膜上解离下来的部位不同。

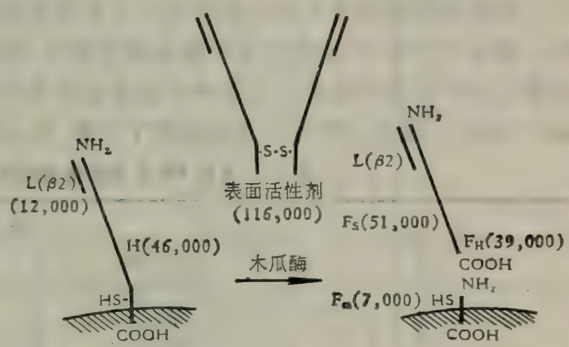


图 4-36 H-2 抗原的分子解剖和在细胞表面的排列。用表面活性剂溶解下来的 H-2 抗原是以两条重链和两条轻链(重链间至少有一个二硫桥连接)的形式存在。木瓜酶处理细胞表面或表面活性剂提取物，均得到大小相同的片段 (Fs)。(H) 为 H-2 重链；L(β2) 为 H-2 轻链 (β-2-微球蛋白)；Fs 为用木瓜酶处理细胞表面或表面活性剂提取得到的水溶性片段(FH ＋L)；FH 为木瓜酶酶解后得到的重链片段；Fm 为木瓜酶切断后，剩下的和膜相连的重链片段，括弧内为分子量 (Henning 等，1976)。

近来有人用木瓜酶处理小鼠细胞膜或借非离子型表面活性剂(NP-40)从膜上溶解下来的 H-2 抗原，得到分子量为 37,000 的糖蛋白片段和与其相连的 β-2-微球蛋白。对H-2 抗原和酶切的糖蛋白的 N 末端分析的结果证明，此片段相当于天然分子的 N 端部分。因此，木瓜酶是在靠近羧基端切断 H-2 抗原分子，结果分子的羧基端部分仍然留在膜上，而 N 端部分释放到溶液内。这提示天然 H-2 抗原分子的羧基端是埋在细胞膜脂双层内，而 N 端则露在膜外的溶液内 (Ewenstein 等，1976)。

根据这许多方面的证据，有人推测 H-抗原分子在细胞膜上的天然存在形式是由四条链构成的类似免疫球蛋白的双体构造 (分子量约为 130,000)。两条轻链 (β-2-微球蛋白)通过非共价相互作用和两条重链相连。两条重链的羧基端埋在膜内，并由位于分子贴近细胞膜处的二硫桥相连接。对重链进行部分酶解表明，它又是由三个致密的功能区彼此通过伸展的一段肽链连接起来的 (Peterson 等，1975)。不过，也有人不同意此分子模型，认为膜上不存在双体构造 (Goodfellow 等，1975)。

最近，Edelman 实验室系统地比较了用表面活性剂或木瓜酶从细胞表面溶解下来的 H-2 抗原及其断片的分子量和部分排列顺序，使这一问题得到了澄清。用表面活性剂溶解的 H-2 抗原的分子量为 116,000，是由二硫桥连接的两条重链(分子量 46,000)和两条由非共价键相连的轻链(分子量 12,000) 形成的四条链的构造，也就是说溶液内的 H-2 抗原是以双体形式存在的。为了了解 H-2 抗原在细胞表面存在的分子形式，在用表面活性剂提取前，先用碘乙酰胺烷基化，以防止重链间二硫桥的形成。当再用木瓜酶消化

细胞或表面活性剂的提取物时，都可以得到由一条分子量 39,000 的重链片段(FH)和一条完整的轻链共同组成的水溶性片段 FS（分子量 51,000）。因此，重链的—S H键应位于剩留在膜上的 Fm 片段上。对 FH 片段的部分氨基酸排列顺序的分析证明是和用表面活性剂从膜上溶解下来的 H-2 抗原的重链相同的，并且相当于重链的 N 端。这些结果表明 H-2 抗原在膜上是以一条重链和一条轻链组成的单体形式存在的，重链的 C 端埋在膜内，而 N 端露在外面(图 4-36)（Henning 等，1976）。

（三）移植抗原的一级结构

由于移植抗原纯化和亚基结构研究方面所取得的进展，一级结构分析也开始进行了。利用氨基酸顺序自动分析仪对小分子亚基进行的放射性同位素标记的氨基酸顺序分析，确定了 3 和 10 残基位置的氨基酸分别为 lys 和 tyr。这和人、家兔、狗的 β-2-微球蛋白的顺序是相符的。也进一步证实小分子亚基相当于 β-2-微球蛋白（Silver 和Hood，1975）。最近，用同一方法确定了小鼠 H-2K 分子 N端 27 氨基酸中 18 残基的顺序

表 4-7　几种 HLA 抗原重链部分氨基酸排列顺序的比较

步　骤*	鉴定的氨基酸		
	HLA-2**	HLA-7,12	HLA-7
1	Gly	Gly	Gly
2	Ser	Ser	Ser
3	—	—	—
4	Ser	Ser	Ser
5	Met	Met	Met
6	Arg	Arg, Val	Arg
7	Tyr	Tyr	Tyr
8	Phe	Phe	Phe
9	Phe	Tyr	Tyr
10	Thr	Thr	Thr
11	Ser	Ala	Ser
12	Val	Val	Val
13	Ser	Ser	Ser
14	Arg	Arg	Arg
15	Pro	Pro	Pro
16	Gly	Gly	Gly
17	—	—	—
18	Gly	Gly	Gly
19	Glu	Glu	Glu
20	—	—	—
21	—	—	—
22	Phe	Phe	Phe
23	Ile	Ile	Ile
24	Ala	Ala	—
25	Val	Val	Val

* Beckman 908B 自动顺序分析仪对N端部分排列顺序的分析结果。数字为分析步骤，示氨基酸顺序。
** 两个 HLA-2 样品分析结果相同。
（据 Terhorst 等，1976）。

表 4-8 H-2 和 HLA 抗原之氨基酸排列顺序的相关性

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
小鼠	K^b	Met	Pro	His		Leu	Arg	Tyr	(Phe)	Val		Ala	Val		Arg	Pro				—		Arg	Tyr	Met				Tyr
H-2	K^k	Met	Pro	His		Leu	Arg	Tyr	(Phe)	His		Ala	Val		Ile	Pro				Lys	(Pro)	Phe	Ala	Met	His			Tyr
	K^d	Met	—	His		–	Arg	Tyr	(Phe)																			
	D^b		(Pro)			—	Arg	Tyr	—	—		Ala	Val		Arg	Pro				—	Pro	Arg	Tyr					
	D^d	Met	(Pro)	His		Leu	Arg	Tyr	Phe	Val		Ala	Val			Pro				—	Pro		Tyr					
人	A2	Gly	Ser		Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Glu				Phe	Ile	Ala	Val		Tyr
HLA	B7	Gly	Ser		Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Gly	Glu				Phe	Ile		Val		Tyr
	A1,2								Phe	Phe	Thr	Ser		Ser														
	B8,13		Ser		Ser	Met	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Val	Ala	Arg	Pro	Gly											

方框内表示同源的残基,括弧内为初步的或有争论的结果。根据 Henning 等,1976; Silver 和 Hood, 1976; Vitetta 等,1976; Terhorst 等 1976; Bridgen 等,1976 的材料整理(据Howard, 1976)。

(Vitetta 等，1976)，如下：

```
                5                          10                     15
Met Pro His—Leu Arg Tyr Phe His—Ala Val—Ile Pro
          20            25
—Leu—Lys Pro Phe Ala----Tyr······
```

对人 HLA-A 和 HLA-B 亚基因座产生的四种 HLA 抗原之 N 端部分排列顺序，以及氨基酸组成分析还证明这些抗原的一级结构存在很大的同源性(表 4-7)。同时，它们和小鼠 H-2 抗原也有一定程度的同源性 (Terhost 等，1976)[1)]。小鼠 H-2K^b，H-2K^d，H-2K^k，H-2D^b 和 H-2D^d 的基因产物的 N 端部分排列顺序也是恒定的 (Henning 等，1976)。表 4.8 总结了现有的 H-2 和 HLA 部分排列顺序相关性的资料。这些资料支持人类的 HLA-A 和 HLA-B，小鼠的 H-2K 和 H-2D 亚基因座都可能是通过基因倍增起源于一个祖先基因的看法。从 H-2 和 HLA 排列顺序上的一定程度的同源性看来，H-2 和 HLA 基因在进化上也可能有共同的起源 (Howard，1976)。

总之，目前关于移植抗原 (主组织相容性基因产物) 的化学特性已得到下述初步了解：小鼠 H-2 和人 HLA 的基因产物是位于细胞表面的糖蛋白，分子量约为 60,000。分子是由重链(分子量为 45,000) 和轻链(已知为 β-2-微球蛋白，分子量为 12,000) 两个亚基非共价相连而成。天然分子在细胞膜上很可能是以单体形式存在，分子的 C 端埋在膜内。完整的分子只能被表面活性剂从膜上溶解下来，在溶液内分子可能以双体形式存在。木瓜酶能将分子从近 C 端处切断，酶解片段仍保持全部抗原活性。移植抗原的血清学专一性依赖于多肽链特定的排列顺序。

移植抗原的化学性质研究所取得的这些进展，在理论上和实践上都是很重要的。随着移植抗原一级结构的逐步阐明，目前移植免疫方面采用的免疫遗传上的血清学专一性系统将可能改变为用结构基因及其产物的氨基酸排列顺序表示的系统。这对于了解移植抗原的遗传控制和分子进化以及生物学功能都将有很大意义。在临床实践上，不同分子量大小的 HLA 抗原片段还可能作为有用的工具，来探讨移植免疫的耐受性，免疫促进现象或封阻抗体的诱导等问题。研究这些问题对于从根本上克服异体组织移植的排斥，也无疑是极为重要的 (Nossal，1972)。

五、生殖细胞的表面抗原

两性生殖细胞含有未来个体全部抗原的遗传信息。然而，这些细胞本身的抗原性却相当贫乏，只是在以后的发育过程中才逐渐显现出来。

卵表面抗原的表现很弱。小鼠未受精卵和早期分裂的胚胎，用萤光标记抗体均不能显示出主要组织相合性抗原 (H-2)，只有一些弱的组织相合性抗原(如 H-1，H-6) 存在 (Palm 等，1971)。未受精卵对抗 H-2 细胞毒性抗体也不敏感。

精子表面有较多的抗原。现在已经知道精子表面和体细胞一样，也有组织相合性抗原、血型抗原以及植物凝集素、病毒的受体存在。成熟的精子只具有单倍染色体。在哺乳动物，性别的决定是由于精子的两型性，半数的精子有 x-染色体，另一半数精子有 y-染色体。精子在细胞遗传学上的这些特点、单倍性以及遗传上的两型性是否在精子表面抗

1) 目前已完成了小鼠 H-2K^b 分子的全部一级结构测定，人类 HLA-B7 和 HLA-A2 的顺序测定也接近完成。这些材料证明 H-2 和 HLA 抗原之氨基酸排列顺序存在很高的同源性(参见补注 2，第 544 页)。

原上也反映出来，是很有理论意义的问题。精子是一个十分特化的细胞。精子的表面抗原对于受精的功能意义，也是值得注意的问题。这里主要讨论几种精子表面抗原。

（一）植物血球凝集素受体

植物血球凝集素作为“分子探针”，用于分析生殖细胞的表面抗原构造也是卓有成效的。

有人发现刀豆凝集素（Concanavalin A）能使哺乳类精子凝集。这种凝集作用能被α-甲基-D-甘露糖苷或葡萄糖专一地抑制。这表明精子表面有含这些糖基团的受体存在。利用萤光标记的刀豆凝集素观察到凝集素集中分布在精子头部顶体区域，在尾部也呈现微弱的萤光。^{125}I 标记刀豆凝集素定量测定的结果表明，小鼠精子和其他体细胞的刀豆凝集素受体的数目大致相同，但是它们在精子表面的分布不平均，主要位于头部（表4-9）（Edelman 和 Millette，1971）。此外，还有人发现仙台副流感病毒能选择地和兔精子顶体细胞膜附着（Buthala 等，1971）。这些事实说明精子膜上受体的分布有局部的分化。

哺乳类卵受精时，精子必须穿过透明带。透明带和受精的物种专一性与防止多精人卵都有重要的关系。用麦芽凝集素（WGA）处理金黄田鼠的卵时，发现 WGA 能和透明带专一地结合，并阻止精子的穿入和受精。同时透明带的外表面的光散射性增加，不再能被蛋白酶酶解。这些事实说明透明带的分子结构发生了明显的变化。WGA 的这种效应能被 N-乙酰-D-氨基葡萄糖专一地抑制，表明透明带表面有这些基团存在。这提示透明带上的这些基团可能与精、卵专一的结合有关系，掩盖这些基团就可能阻止受精（Oikawa 等，1973）。虽然透明带只是细胞的分泌产物，而不是卵的表面抗原，但是上述实验间接地说明透明带上的某些基团和精子表面某些构造之间存在专一结合的关系。已知某些无脊椎动物，如海胆卵的受精素（卵膜）和精子表面的抗受精素之间存在类似抗原抗体的相互作用，这种相互作用和受精的物种专一性有很大的关系（Tyler，1955）。以上的发现提示，哺乳类生殖细胞之间也可能存在类似的关系。对卵膜和精子表面抗原的深入研究，对于了解受精的机制以及探索在受精环节控制生育的可能性，都将有重要

表 4-9 精子和体细胞表面刀豆凝集素A受体的数目

细胞类型	每一细胞上受体的数目
精子	4.9×10^7
头部	7.9×10^6
尾部	2.5×10^6
胸腺	1.6×10^7
脾	1.4×10^6
淋巴球	1.3×10^7
红血球	6.8×10^6
肾	3.4×10^7
肝	3.0×10^7
睾丸	5.1×10^7

（据 Edelman 和 Millette，1971）。

的意义。

（二）组织相容性抗原

应用萤光标记抗体、细胞毒性实验等方法，都证明小鼠精子表面有H-2、弱的H-3和H-13抗原存在（Vojtiskova，1969；Goldberg 等，1970）。也证明人类精子表面有HLA抗原存在，并且可能相当于单倍基因组的表现。有人在精子表面测出八种HLA抗原。当用其中一种抗原的抗血清处理杂合子男人的精子时，约一半精子溶解。由此下结论，精子表面的HLA抗原或许是由单倍基因组决定的。对于双基因杂合子男人精子的研究更加证实了这一结论。这些人的精子可能分为两种类型：1）此两基因分别位于成对染色体的每一个染色体上；2）此两基因同时位于一条染色体上，其中任一基因都不位于另一条染色体上。如果在精子成熟过程中，染色体减数和分离后基因活动仍有表现的话，当用此两抗原的抗血清处理时，则1）型精子将全部溶解；2）型只有一半溶解。实验结果证实了这种预计（Fellous 和 Dausset，1970）。酶标记免疫电子显微镜观察，发现HLA抗原均匀地成片分布或偶尔分散地分布在精子头部，而器官专一抗原则分布在头部，有时分布在中段（Keuk 等，1973；Vojtiskova 等，1974）。从以上这些观察结果以及上述受体的分布的情形看来，精子上功能不同的区域，抗原分布也有所不同。膜抗原分布的这种局部分化反映了精子细胞膜的特点，膜成分的流动性似乎受到某些限制。

（三）H-Y 抗 原

在同基因型纯系小鼠之间，将雄鼠皮肤移植到雌鼠能引起排斥反应。反之，将雌鼠皮肤移植到雄鼠，或雌鼠彼此之间皮肤移植，均不发生移植免疫反应。这表明有和Y染色体相连的移植抗原存在，称为H-Y抗原。Goldberg 等（1971）用专一的抗H-Y血清进行的细胞毒性实验证明，50％以上的小鼠精子表面存在H-Y抗原。以TMV作标记之免疫电子显微镜研究，还观察到H-Y抗原的分布限于精子头部顶体区域（Koo 等，1973）（图4-37）。既然精子由于性染色体的差异而在表面抗原上（至少部分地）呈现两型差异，理论上，就有可能用免疫选择方法改变X精子和Y精子的比例，从而改变子代的性比。最近，有人在这方面进行了初步的尝试。在离体条件下，用抗H-Y血清和补体处理小鼠精子，期望能选择地杀死Y精子。然后用这样处理过的精子对雌鼠作人工授精。结果在产生的子代中，性比表现出微小的在统计上有意义的变化。对照组雄性占53％，而实验组占45％。也就是说，在实验组雌性增加了8％（Bennett 和 Boyse，1973）。这说明在一定程度上对Y-精子进行免疫选择是可能的。最近，用专一的抗小鼠H-Y血清进行的混合吸附和细胞毒性实验还证明，大鼠、豚鼠、家兔和人的H-Y抗原和小鼠的H-Y抗原在血清学上有交叉反应（Wachtel 等，1974）。这种交叉反应是否可用来对异种的Y精子作免疫选择，值得用实验去验证。

最近，Bennett 实验室发现小鼠早期胚胎（桑椹胚），畸态瘤和精子上存在一个共同细胞表面抗原（Yanagisawa 等，1974）。后来，进一步发现人类精子上也有这一共同

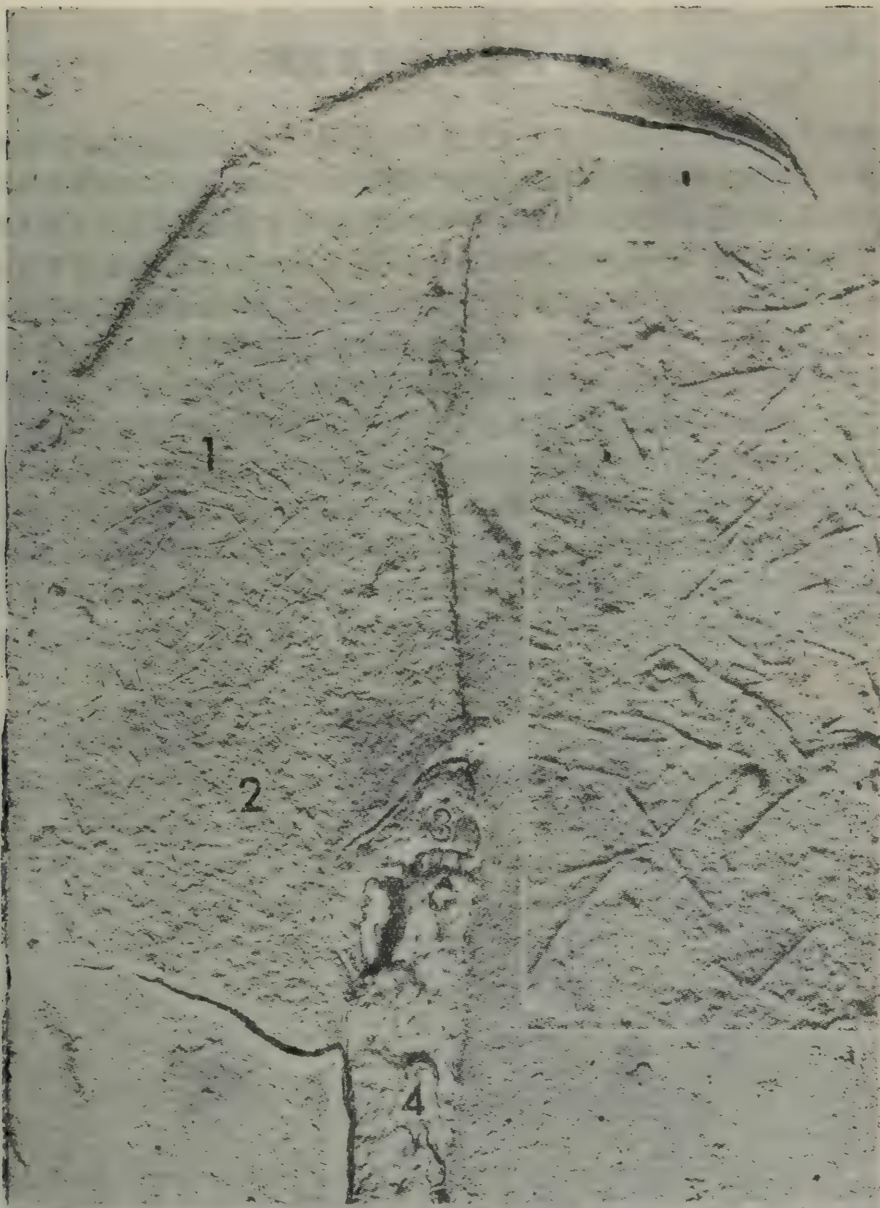


图 4-37 TMV 和 H-Y 抗原复合物标记的小鼠精子头部的摹本。TMV 标记分布限于顶体区域(1)，顶体后区(2)和联合段(3)都没有（×17,000）。插图：标记的顶体区域之较高的放大倍数(×50,540)，示 TMV 标记的规则的分布(据 Koo 等，1974)。

抗原存在。在小鼠，这一共同抗原是由 t 基因座野生型等位基因决定的，其突变等位基因（t^{12}）为纯合子时是致死的。发育停顿在桑椹期导致胚胎的死亡。由此可见，此细胞表面抗原很可能在早期胚胎发育中起某种重要的作用（Buc-Caron 等，1974）。

在正常发育过程中，不同发育时期的胚胎都可能有时期专一的表面抗原出现，完成一定的形态发生的或生理的功能，而在成体就消失或量上大大减少。只有在瘤变时，基因去抑制，才可能重新表现出来，呈现为所谓的"癌胚性抗原"（Koldovsky，1974）。

六、肿瘤细胞表面抗原

如前所述，肿瘤细胞表面抗原的变化是正常细胞转化为恶性细胞时最早出现的特征。这种变化非常复杂，既可能包括正常细胞原有的几类主要表面抗原(物种专一抗原、组织专一抗原、组织相容性抗原、植物血球凝集素受体等)在数量上和空间分布上的变动，也可能出现新的、肿瘤专一的抗原。肿瘤细胞抗原的复杂性，从简图 4-38 可看出来。

目前在实验动物上有大量证据证明，无论肿瘤病毒，化学致癌物质或物理因子引起的肿瘤都具有肿瘤专一抗原。所谓肿瘤专一是指该类抗原是宿主正常组织没有的、癌变过程中新产生的，因而对原发宿主表现相当强的外源性，能被宿主识别，产生抗体或其他免疫反应。这些新抗原，若位于细胞膜上则可能在自体或同基因型异体宿主引起移植免疫反应，导致肿瘤的排斥。因此，也可以称为肿瘤专一移植抗原 (Tumor specific transplantation antigen，简称 T. S. T. A.)。一般说来，化学致癌物质引起的 T. S. T. A. 是每一肿瘤细胞株专一的，而与其他肿瘤，甚至同一化学致癌物质在其他个体上诱发的同一类型的肿瘤也没有交叉反应[1]。另一方面，同一种病毒诱发的所有肿瘤，不论其组织发生或动物来源的不同，都可能存在共同的病毒诱发的细胞表面抗原

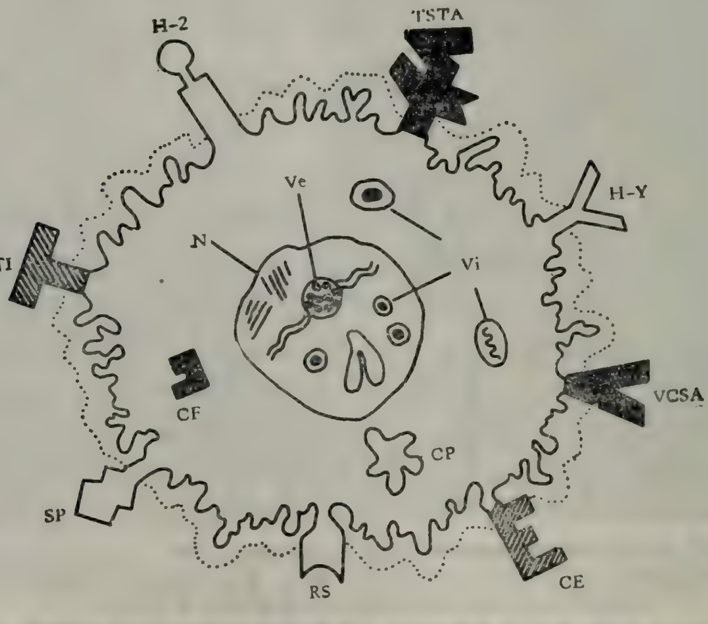


图 4-38 癌细胞表面抗原和细胞内抗原示意图。(SP)为物种专一抗原，(H-2、H-Y)为组织相容性抗原，(TI)为组织专一抗原，(CE)为癌胚性抗原，(TSTA)为肿瘤专一移植抗原，(VCSA)为病毒诱发细胞表面抗原，(RS)为植物血球凝集素受体，(Ve, Vi)为病毒体结构抗原，(N, CF)为 DNA 病毒诱发的新抗原，(CP)为癌胎盘抗原(据 Hauschka, 1973)。

1) 最近发现 $H\text{-}2^d$ 基因型纯系小鼠的化学致癌物质诱发的肿瘤表现出属于其他品系的 H-抗原 ($H\text{-}2^b$ 和 $H\text{-}2^k$)，并认为就是该肿瘤的肿瘤专一移植抗原。这提示化学诱发的肿瘤专一抗原是组织相容性基因随机突变的产物，因此其抗原性可能是瘤株专一的。不过，肿瘤专一抗原是去抑制的或突变的H-基因的产物，有无普遍意义还不能肯定。目前至少已知一种肿瘤的肿瘤专一抗原和 H-抗原是不同的分子(据 Davies, 1975)。

(VCSA)。这种出现在细胞表面的抗原是受病毒基因控制的宿主细胞的产物，而不是病毒本身的抗原。在这些新出现的抗原中，其中一些并非真正是肿瘤特有的抗原，它们实际上可能在一定的胚胎发育时期曾经出现过，或者在其他正常的成体组织就有存在。和它们有关的基因，在正常情形下受到抑制，只是在瘤变过程中由于基因表达失常，才在错误的时间或错误的地点表现出来。属于前一情形的，如所谓的癌胚性抗原(CE)。属于后一情形的，如某些非内分泌器官在形成肿瘤后可以分泌某些激素，所谓外位性抗原，或产生胎盘组织特有的抗原，所谓癌胎盘抗原(CP)。严格说来，只有在任何发育时期、任何正常组织中从来未出现过的抗原，才能算是真正的肿瘤专一抗原。这种抗原是否存在，还是一个有争论的问题。

肿瘤的免疫诊断和免疫治疗都取决于肿瘤有没有专一的抗原。从理论上讲，很可能只有肿瘤细胞表面抗原才能有效地引起保护性免疫反应，用于肿瘤的免疫治疗。同时，这些抗原从细胞膜上溶解下来后，又可能用于免疫诊断。近年来，国外许多实验室正致力于表面抗原的分离、纯化的研究。但遇到除研究一般细胞膜抗原的困难外，还存在同种异体抗原的干扰等特殊困难，这方面的进展仍很缓慢。关于肿瘤抗原化学结构的知识几乎还是空白。目前对于这样一个重要的问题还只能粗陈梗概。

(一) 化学诱发肿瘤的表面抗原

化学致癌物质诱发的肿瘤，用超声处理等方法从细胞膜上溶解下来的抗原，能在同基因型的豚鼠引起移植免疫反应，并且保持瘤株专一的抗原性(Oettgen 等，1968；Holmes 等，1970)。后来，用 3*M* KCl 也成功地从二乙基硝胺诱发的豚鼠肝癌细胞分离出一个膜抗原，分子量范围约在 75,000—150,000 之间，用迟发型皮肤超敏反应测试时，表现出专一的肿瘤抗原活性(Meltzer 等，1971)。此外，从氨基偶氮染料诱发的大鼠肝癌，用木瓜酶有限制消化，从膜上溶解下来的成分，再经 Deae-纤维素层析分离出一个抗原成分，它能专一地抑制萤光标记的肝癌抗血清和肝癌细胞膜的结合(Baldwin 和 Glaves，1972)。

(二) 病毒诱发肿瘤的表面抗原

Smith 等(1970)最先报告从 SV 40 病毒诱发的肿瘤，用木瓜酶消化法，从细胞膜溶解和分离出肿瘤专一的抗原，能专一地抑制离体的细胞毒性反应。但是，在 Sephadex-G 150 分离的各部分中，抗原活力分布很广，因而无法判断其分子性质。后来有人从小鼠 RBL-5 白血病细胞分离出一个初步纯化的可溶性表面抗原，能引起专一的移植免疫反应。从凝胶过滤的洗脱行为估计分子量约为 50,000—60,000。同时，还证明它不是白血病病毒的抗原成分，而可能代表病毒转化的瘤细胞的一个新的表面抗原成分(Law 和 Appella，1973)。

(三) 人消化道癌胚性抗原(CEA)

Gold 实验室经过严格的对照实验，用取自同一肠段的正常组织作对照，以减少同

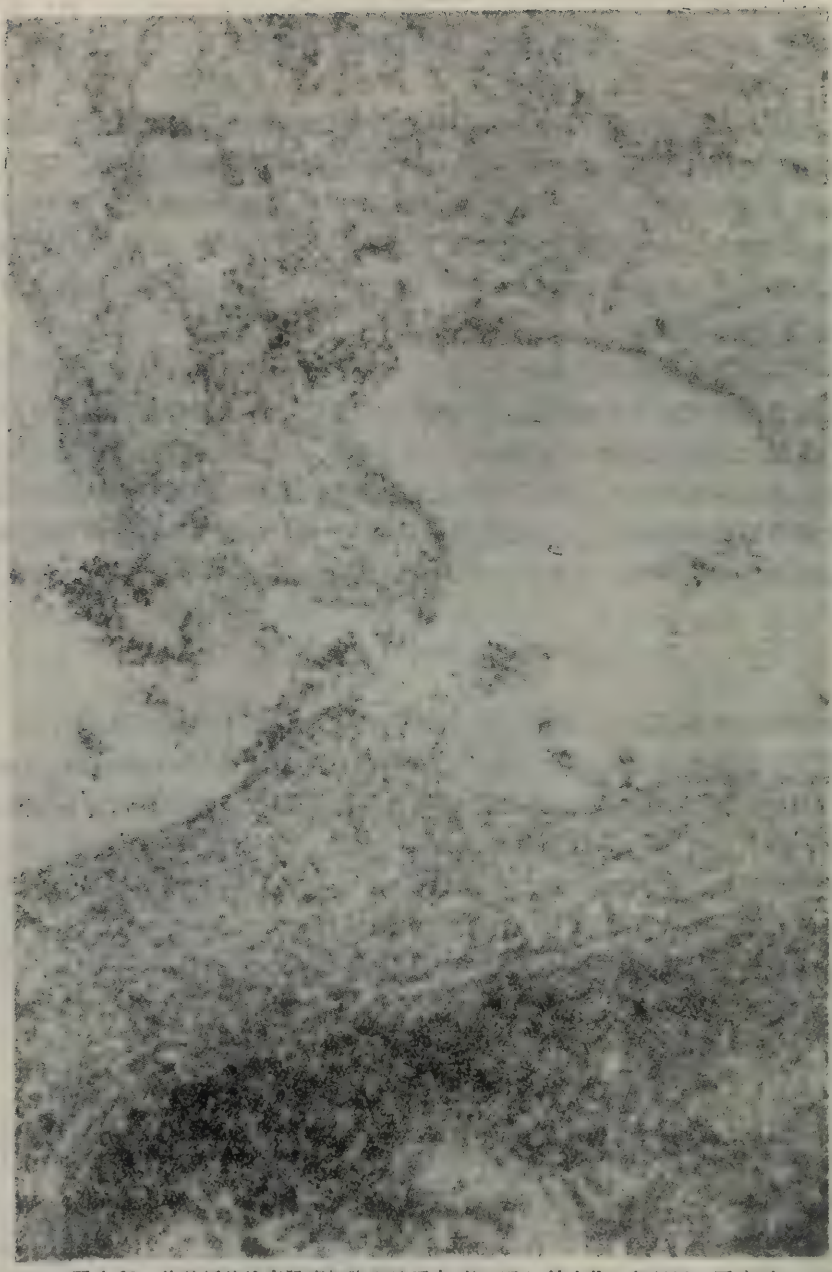


图 4-39　体外暂养的直肠癌细胞和铁蛋白-抗 CEA 结合物一起保温，固定时和固定后均未加钌红染糖蛋白(×240,000)(据 Gold 等,1970)。

种异体抗原的干扰，证明人类结肠癌组织存在一种专一的抗原 (Gold 和 Freedman, 1965)。这种抗原是正常结肠组织所没有的，而在 2—6 个月胎儿的肠、胃、胰等组织中存在，因此称为癌胚性抗原 (Carcinoembryonic antigen, 简称 CEA)。他们还假定这种抗原是内胚层来源的胎儿消化道组织共同的发育时期专一的抗原，癌变时由于基因的去抑制，又重新表现出来。进一步萤光免疫组织化学和铁蛋白标记抗体电子显微镜观察，证明 CEA 位于癌细胞表面的糖蛋白外被上(图 4-39) (Gold 等, 1970)，并能释放进

表 4-10 CEA 的氨基酸和单糖组成

单糖分析		氨基酸分析	
单糖	微克分子/mgCEA	氨基酸	微克分子/mgCEA
L-岩藻糖	0.15	赖氨酸	0.06
D-甘露糖	0.49	组氨酸	0.03
D-半乳糖	0.62	精氨酸	0.08
N-乙酰-D-氨基葡萄糖	0.97	天冬氨酸	0.375
		苏氨酸	0.22
唾酸	0.24	丝氨酸	0.27
		谷氨酸	0.26
		脯氨酸	0.19
		甘氨酸	0.13
		丙氨酸	0.14
		缬氨酸	0.16
		异亮氨酸	0.12
		亮氨酸	0.22
		酪氨酸	0.06
		苯丙氨酸	0.05

(据 Banjo 等,1972)。

表 4-11 纯化 CEA 的低聚糖片段的单糖组成和免疫学活力

片段号	水解条件		层析迁移	片段之免疫学活力/纯 CEA 之免疫学活力 (%)	低聚糖片段之单糖组成(微克分子)			
	温度(℃)*	时间(小时)	距离(厘米)		岩藻糖	甘露糖	半乳糖	N-乙酰-氨基葡萄糖
1	60	6	5—10	0.016	—	—	—	0.365
2	86	6	5—10	0.024	—	0.25	—	0.006
3	86	24	5—10	0.013	—	—	—	0.047
4	86	72	15—20	0.016	—	—	—	0.254
5	86	96	15—20	0.000	—	—	—	—

* 86℃ 水解时间是指先在 60℃ 水解 48 小时后再在此温度水解的小时数。
(据 Banjo 等,1972)。

入血流中，因而可能对消化系统癌症有诊断价值。因此，这一发现在理论上和临床实践上都曾引起很大的兴趣（Gold，1971）。

结肠癌组织的过氯酸（1.0*M*）提取液，可经凝胶过滤和制备电泳等步骤纯化。纯化的 CEA 在理化性质上是均一的，超离心沉降常数为 8.05 S，免疫电泳上表现为 β-球蛋白区域的一条带（Krupey 等，1972）。化学性质上，CEA 是一个糖蛋白(糖和蛋白的比例约为 2⋯3:1)。根据间接的证据提示抗原决定簇可能和糖基团有关系（Gold 等，1971）。对 CEA 化学组成的分析表明，其特点是不含 N-乙酰-氨基半乳糖，而含有相当量的甘露糖(表 4-10)。已知前者是血型 A 抗原的免疫优势基团，而后者又是血型 A 抗原所没有的。因此，纯化的 CEA 分子并不含血型 A 的抗原决定簇。利用聚苯乙烯磺酸对 CEA 作可控制的水解，得到 4 个低聚糖片段，用放射免疫法测定时，均表现抗原活性(表 4-11)。所有这 4 个低聚糖片段，都含有 N-乙酰氨基葡萄糖。在片段 1、3、4 这实

际上是唯一的单糖成分。片段 2 的免疫学活性和其他几个片段比起来最高，它的 N-乙酰氨基葡萄糖的含量相当低，并含有甘露糖。虽然 N-乙酰氨基葡萄糖本身并不能抑制 CEA-抗 CEA 的结合，但是这些结果似乎提示，含 N-乙酰氨基葡萄糖的低聚糖可能和 CEA 的抗原决定簇有重要关系。这一氨基糖或许可能作为免疫优势基团的核心，或许也可能是肿瘤抗原决定簇本身的一个组成部分（Banjo 等,1972）。近来,利用一系列低聚糖对 CEA 抗原抗体系统的抑制实验进一步证明三-N-乙酰壳三糖（Tri-N-Acetylchitotriose）类型的构造可能是 CEA 的一个抗原决定簇（Anderson 等，1975）。

最近，另一些作者报道，即使从同一个肠癌材料也可以分离出分子量不同的 CEA（6.8S 和 10.1S），通常为 6.8S（Coligan 等，1972）。这样纯化的 CEA 若用 Ecteola-纤维素和等电点聚焦法进一步分析时，又表现出不均一性。由此得到的几个部分的唾酸和氨基糖含量也是不均一的，但都表现抗原活性。当用神经氨酸酶处理,去除唾酸后,等电点聚焦时表现的不均一程度就减少了（Coligan 等，1973）。这说明 CEA 电荷不均一性可能是受到唾酸含量不同的影响。另一方面，不同实验室和不同病人的 CEA 样品的氨基酸组成也是相似的，说明所有结肠癌 CEA 抗原的蛋白部分是相似的。由此可见，纯化 CEA 表现的电荷不均一性可能是由于同一抗原在分离、纯化过程中唾酸和氨基糖有不同程度的解离所致。这再次表明了细胞表面糖蛋白抗原分离和纯化的特殊困难。

从结肠癌分离 CEA 过程中，还伴随出现一个分子量较小的糖蛋白(大约 3—4S),在琼脂双扩散上和 CEA 有部分的免疫学交叉反应(图 4-40)。然而，它在其他正常组织中也可能存在，既不是器官专一的、也不是肿瘤专一的抗原，因而称为非专一的交叉反应抗原(NCA)。临床上 CEA 放射免疫测定中,某些非消化道癌症病人出现假阳性，可能就是由于它的干扰（Kleist 等，1972）。相隔不久，不同的作者都证实此抗原的存在,所谓“NGP”(Mach 和 Puszataszeri，1972)，“CCEA-2”都可能是和 NCA 相同的或相近的抗原（Turberille 等，1973）。由于 CEA 和 NCA 两种抗原具有一部分共同的抗原决定簇，用 CEA 免疫动物时得到的抗血清可能有不同的专一性，和 CEA 分子上的不同抗原决定簇起反应。一种抗血清能和存在于恶性和正常组织中的 NCA 起反应，表明两种分子有共同的抗原决定簇。第二种抗血清只能和 CEA 起反应，而不能和 NCA 起交叉反应，证明 CEA 有独特的抗原决定簇的存在。第三种，也是最常见的一种抗血清不能区分 CEA 和 NCA，和它们有同样好的反应。倘若用这种抗血清来探讨 CEA 的独特抗原决定簇的存在时，就会得出错误的结论（Tomita 等，1974）。因此，在区别肿瘤和正常组织的抗原异同时，选择适当专一性的抗血清有决定性意义。这是肿瘤免疫诊断特别应注意的地方。

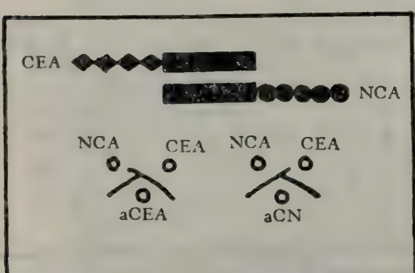


图 4-40 琼脂双扩散反应证明 CEA 和 NCA 分子可能具有一部分共同的、又各自有一部分独特的抗原结构。(aCEA)为抗 CEA 血清;(aCN)为抗正常结肠粘膜血清(据 Kleist 等,1972)。

总之，CEA 是位于结肠癌细胞表面的糖蛋白外被上的大分子抗原。严格说来,并不是细胞膜本身的结构抗原。和其他消化道上皮的糖蛋白外被一样，它们是在细胞内合成后输送到细胞表面的。这些高度水溶性的糖蛋白，能释放到肠道内，再进入循环，因而

可以在血液中测出来。虽然在多数局限性肠癌病人血液内有抗 CEA 抗体存在，但没有抑制肿瘤生长的保护作用。另一方面，也没有证据能肯定 CEA 可能引起细胞免疫反应。这些特点都可能是和 CEA 在细胞表面上的地位以及抗原特性有关系的。

起初曾认为血清 CEA 可作为消化道肿瘤免疫诊断的专一抗原。后来临床上发现一些其他肿瘤或疾病，如乳癌、肺癌和结肠溃疡等，也可能呈现假阳性。这可能是受到 NCA 这类抗原的干扰。因此，诊断的专一性仍有疑问，还需在实践中研究改进，而关键又在于选择只和 CEA 独特的抗原决定簇反应的抗血清。此外，肠癌全部切除时，血流中 CEA 相当迅速消失，复发时又重新出现。这说明 CEA 在肠癌手术预后方面，仍然是有价值的。

在严格的意义上，人类肿瘤是否存在真正专一的肿瘤抗原，还是一个有争论的问题。如果认为就基因表现而论，在全部正常发育过程中从未出现过的抗原，才能算是专一的话，那只有起源于遗传变异的瘤细胞，理论上才可能有“肿瘤专一”抗原存在。如果对“专一抗原”理解为和恶性生长共同特征相关联的抗原，则不能排斥其较普遍存在的可能性。有人发现所有测试过的恶性肿瘤(良性肿瘤除外)病人的淋巴球都能和诱发自体免疫性脑脊髓炎的髓鞘碱性蛋白（A. I.），以及按和提取 A. I. 蛋白质相同的方法从许多种肿瘤提取出的蛋白质起专一的免疫反应，产生能使正常豚鼠的巨噬细胞在电泳场中移动速度减慢的因子（Macrophage slowing factor，MSF）。从经过长期培养的 HeLa 癌细胞分离细胞膜，还证明这一抗原存在于细胞膜上（Dickinson 等，1972）。所以，理论上这一抗原可能用于恶性肿瘤的鉴别诊断，或许还可能用于免疫治疗。近来在临床上已开始试用于恶性肿瘤的诊断（Pritchard 等，1972，1973；Preece 和 Light，1974）。

总括起来，癌细胞的恶性特征，侵润、转移和失去生长控制等，都是和细胞表面抗原的改变有密切关系的。肿瘤专一抗原的存在是肿瘤免疫诊断和免疫治疗的前提。并且在理论上很可能只有肿瘤细胞表面抗原才能产生有效的保护性免疫反应，达到排斥肿瘤的目的，因为无论抗体或致敏的淋巴球都必须通过瘤细胞表面，才能识别和选择地杀伤瘤细胞。由此可见，肿瘤细胞表面抗原的分离、纯化和结构研究的重要性。推而广之，移植免疫问题的解决也有待于对组织相容性抗原的更深入的了解，选择或改变一定的抗原，以期在成体诱导免疫耐受性或封阻抗体，达到克服异体移植的免疫排斥的目的。同样地，生殖细胞表面抗原的研究对于控制生育的意义也是显而易见的。目前这些方面的研究还很初步。这主要是由于对细胞膜结构知识还相当贫乏，以及膜抗原的分离、纯化和结构分析方法不完善的限制。由于上述肿瘤免疫和异体移植等方面的实际需要，必然会促进细胞表面抗原研究工作的加强并加速其进展。

参 考 资 料

专著和综述

Billingham. R. and Silvers. W (1971). The Immunobiology of Transplantation. Englewood Cliffs. Prentice-Hall.

Boyd. W. C. (1962). Introduction to immunochemical specificity, Interscience.

Braun, V. (1973). Molecular organization of the rigid layer and the cell wall of *Escherichia coli*. In: ''Bacterial Lipopolysaccharides'' ed. by E. H. Kass and S. M. Wolff, The University of Chicago Press.

Burger, M. M. (1973). Surface changes in transformed cells detected by lectins. *Fed. Proc.* **32**, 91.

Cook, G. M. W. and Stoddart, R. W. (1973). Surface carbohyrates of the eukaryotic cell, Acad. Press.

Jamieson, G. A. and Greenwalt, T. J. (1971). Glycoproteins of blood cells and plasma, J. B. Lippincott Comp.

Kahn, B. D. and Reisfeld, R. A. (1972). Transplantation antigens, Academic Press.

Koldovsky, P. (1974). Carcinoembryonic antigens, Springer-Verlag.

Korn E. D. (1969). Current concepts of membrane structure and function. *Fed. Proc.* **28**. 6.

Nowotny, A., ed. (1972). Cellular antigens, Springer-Verlag.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720.

论文

Allen, J. M. and Cook, G. M. W. (1970). A study of the attachment phase of phagocytosis by murine macrophages. *Exp. Cell. Res.* **59**, 105.

Allison, A. C., Davies, P. and de Peters, S. (1971) Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis. *Nature New Biol.* **232**, 153.

Anderson, B., Jameson, A., Hirata, A. A., Safford, J. W. and Tomita, J. T. (1975). Carcinoembryonic antigen-identification of a tri-N-acetylchitotriosyl type structure as an immunodeterminant group. *Immunochemistry* **12**, 577.

Aub, J. C., Tieslau, C. and Lankester, A. (1963) Reactions of normal and tumour cell surfaces to enzymes. I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **50**, 613.

Baldwin, R. W. and Glaves, D. (1972). Solubilization of tumour-specific antigen from plasma membrane of an aminoazo-dye induced rat hepatoma. *Clin. Exp. Immunol.* **11**, 51.

Banjo, C., Gold, P., Freedman S. O. and Krupey, J. (1972). Immunologically active heterosaccharides of carcinoembryonic antigen of human digestive system. *Nature New Biol.* **238**, 183.

Beker, J. W., Reeke, G. N., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. (1975). New evidence on the location of the saccharide-binding site of concanavalin A. *Nature* **259**, 406.

Bennett, D. and Boyse, E. A. (1973). Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature* **246**, 308.

Boyse, E. A., old, L. J. and Stockert, E. (1968). An approach to the mapping of antigens on the cell surface. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **60**, 886.

Bridgen, J., Snary, S., Crumpton, M. J., Barstable, C. Goodfellow, P., and Bodmer, W. F. (1976). Isolation and N-terminal amino acid sequence of membrane-bound human HLA-A and HLA-B antigens. *Nature* **261**, 200.

Buc-Caron, M.-H., Gachlin G., Hofnung, M. and Jacob, F. (1974). Presence of a mouse embryonic antigen on human spermatozoa. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 1730.

Burger, M. M. and Goldberg, A. R. (1967). Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic surfaces. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **57**, 359.

Burger, M. M. (1969). A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **62**, 994.

Burger, M. M. and Noonan, K. D. (1970). Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumor cell surface. *Nature* **228**. 512.

Buthala, D. A., Ericsson, R. J., and Chubb, G. T. (1971). Interaction of Sendai virus and rabbit sperm: transmission and scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* **5**, 325.

Callahan, G. N., Stocoechmann, I. and DeWitt, C. W. (1974). Separation of "species" and major histocompatibility antigen in the rat. *Immunol.* **27**, 1141.

Ceppellini, R. (1971) Old and new facts and speculations about transplantation antigens of man. In: "Progr. Immunol. I.", ed. Amos, B. D., Acad. Préss, p. 973.

Cline, M. J. and Livingston, D. C. (1971). Binding of ^{3}H-concanavalin A by normal and transformed cells. *Nature New Biol.* **232**, 155.

Coligan, J. E., Lautenschleger, J. T. Egan, M. L. and Todd, C. W. (1972). Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen. *Immunochem* **9**, 377.

Coligan, J. E., Henkart, P. A., Todd, C W and Terry, W. D. (1973). Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen. *Immunochem.* **10**, 591.

Cook, G. M. W. and Eylar, E. H. (1965). Separation of the M and N blood group antigens of the human erythrocyte. *B. B. A.* **101**, 57.

Cresswell, P., Turner. M. J. and Strominger, J. L. (1973). Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.). **70**, 1603.

Cresswell, P., Springer, T., Strominger, J. L., Turner, M. J., Grey, H. M. and Kubo, R. T. (1974). Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens and β-2-microglobulin and its turnover on the cell membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) 71, 2123.

Cullen. S E., Schwartz, B. D., Natheson. S. G. and Cherry, M. (1972). The molecular basis of codominant expression of the histocompatibility-2 genetic region. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69** 1394.

Cunningham, B. A. (1974). β-2-mieroglobulin: An immunoglobulin domain asociated with cell surfaces. Progr. Immunol. II, Vol. 1, Immunochem. Asp., p. 5.

Davies, D. A. L (1975). What are tumor-specific antigens. *Nature* **254**, 653.

Davis, R. F. and Bakerman. S. (1972). Isolation of the blood group A receptor component from human erythrocyte membrane. In: ''Cellular antigens'', p. 121.

Dautigny, A. Bernier, I., Colombani, J. and Jolles. P. (1973). Purification and characterization of HL-A antigens from human platelets, solubilized by the non-ionic detergents. *B. B. A.* 298, 783.

Davson. H. and Danielli, J. F. (1043). The permeability of natural membrane, Cambridge Univ. Press.

Dickinson, J. P., et al. (1972). Localization of tumor specific antigen on external surface of plasma membrane. *Nature New Biod.* **239**, 181.

Edelman, G. M. and Millette, C. F. (1971). Molecular probes of spermatozoa structures. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.). **68**, 2436.

Edelman, G. M., et al. (1972). The covalent and three-dimensional structure of concanvalin A. *Proc. Nat Acad. Sci.* **69**, 2580.

Fellous. M. and Dausset. J. (1970). Probable haploid expression of HL-A antigens on human spermatozoon. *Nature* **225**, 191.

Ewenstein B. M.: Freed. J. H. Mole, L. E. and Nathenson, S. G. (1976). Localization of the papain cleavage site of H-2 glycoproteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **73**, 915.

Frye, L. D. and Edidin, M (1970). The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* **7**, 319.

Furthmayr, H. (1978). Structural comparison of glycophorins and immunochemical analysis of genetic variants. *Nature* **271**, 519.

Glynn, R. D., Thrash, C. R. and Cunningham D. D. (1973). Maximal concanavalin A-specific agglutinability without loss of density-dependent growth control. *Proc. Nat Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 2676.

Gold, P. (1971). Antigenic reversion in human cancer. *Ann. Rev. Med.* **22**, 85.

Gold P. and Freedman, S. O. (1965). Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**, 439.

Gold, P.. Krupey, J. and Ansari, H. (1970). Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface. *J. Nat. Cancer Inst.* **45**, 219.

Goldberg, E., Aoki, T. Boyse, E. A. and Bennett. D (1970). Detection of H-2 antigens on mouse spermatozoa by the cytotoxicity test. *Nature* **228**, 570.

Goldberg. E., et al. (1971). Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature* **232**, 478

Goodfellow. P.. Bodemer W. F. and Crumpton, M. J. (1975). Evidence against a dimeric structure for membrane-bound HL-A antigens. *Nature* **258**, 240.

Greenaway, P. J. and Levine, D. (1973). Binding of N-acetyl-neuraminic acid by wheat-germ-agglutinin. *Nature New Biol.* **241**, 191.

Hakamori. S. (1970) Cell density-dependent changes of glycolipid concentrations in fibroblasts. and loss of this response in virus-transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **67**, 1741.

Hauschka, T. S., Tumor Immunity. In: ''Principles of Immunology'' Rose, N. R., et al., ed., MacMillan, N. Y.. p. 417.

Henning, R. Milner, R. Reske, K. Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. (1976). Subunit structure, cell surface orientation, and partial amino-acid sequence of murine histocompatibility antigens *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **73**, 118.

Holmes, E. C., Kahn, B. D. and Morton, D. L. (1970). Soluble tumor-specific antigens from methylcholanthrene-induced guinea pig sarcoma. *Cancer* **25**, 373.

Howard, J. C. (1976). H-2 and HLA sequences *Nature* **261**, 189.

Howe, C. and Bächi, T. (1973). Localization of erythrocyte membrane antigens by immune electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **76**. 321.

Inbar, M., Ben-Bassat, H. and Sachs, L. (1971). A specific metabolic activity on the surface membrane in malignant cell transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **68**. 2748.

Jansson, V. K. and Burger, M. M. (1971). Complex carbohydrates in transformed cell surfaces as indicators for functional changes. In: "Glycoproteins of blood cells and plasma", p. 267.

Jirgensons, B. and Springer, G. F. (1968). Conformation of blood-group and virus receptor glycoproteins from red cells and secretions. *Science* **162**. 365.

Kerek, G., Biberfeld, P. and Afzelius, B. A. (1973). Demonstration of HL-A antigens. "species" and "semen"-specific antigens on human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* **18**, 145.

von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P. (1972). Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with carcinoembryonic antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 2492.

Koo, G. C., Stackpole, C. W., Boyse, E. A., Hämmerling, U. and Lardis, M. P. (1973). Topographical localization of H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. *Proc. Nat Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 1502.

Kornfeld, S. and Kornfeld, R. (1969). Solubilization and partial characterization of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **63**, 1439.

Kornfeld, S. and Kornfeld, R. (1971). The structure of phytohemagglutinin receptor sites. In: "Glycoproteins of blood cells and plasma" p. 50.

Krause, R. M. (1972). Polysaccharides of hemolytic streptococci. In: "Cellular Antigens", p. 88.

Krupey, J., Wilson, T., Freedman, S. O. and Gold P. (1972). The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochem.* **9**, 617.

Law, L. W. and Appella, E. (1973). Immunogenic properties of solubilized tumour antigen from an RNA virus transformed neoplasm. *Nature* **243**. 83.

Lightbody, J. J., Urbani, L. and Poulik, M. D. (1974). Effect of β-2-microglobulin antibody on effector function of T-cell mediated cytotoxicity. *Nature* **250**, 227.

Lorusso, D. L. and Green, F. A. (1975). Reconstitution of Rh(D) antigen activity from human erythrocyte membranes solubilized by deoxycholate. *Science* **188**, 66.

Lucy, J. A. (1968). Ultrastructure of membranes: micellar organization *Br. Med. Bull.* **24**, 127.

Mach, J. P. and Puszataszeri, G. (1972). Carcinoembryonic antigen (CEA): demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochem.* **9**, 1031.

Marchesi, V. T. and Andrews, E. P. (1971). Glycoproteins: isolation from cell membrane with lithium diiodosalicylate. *Science* **174**, 1247.

Marchesi, V. T., Tillack, T. W. and Scott R. E. (1971). The role of glycoproteins in red cell membrane structure. In: "Glycoproteins of blood cells and plasma", p. 94.

Marchesi, V. T., Tillack, T. W., Jackson, R. L., Segrest, J. P. and Scott, R. E. (1972). Chemical characterization and surface orientation of the major glycoprotein of the human erythrocyte membrane *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**. 1445.

Meltzer, M. S. Leonard, E. J., Rapp, H. J. and Borsos, T. (1971). Tumor specific antigen solibilized by hypertonic potassium chloride. *J. Nat. Cancer Inst.* **47**. 703.

Minio, F., Howe, C., Hsu, K. C. and Rifkind, R. A. (1972). Antigen density on differentiating erythroid cells. *Nature New Biol.* **237**, 187.

Nakamuro, K., Tanigaki, N. and Pressman, D. (1973). Multiple common properties of human β-2-microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (*U. S. A*) **70**, 2863.

Nathenson, S. G. (1970). Biochemical properties of histocompatibility antigens. *Ann. Rev. Genetics* 4. **69**.

Nathenson, S. J. and Muramatsu, T. (1971). Properties of the carbohydrate portion of mouse H-2 alloantigen glycoproteins. In. "Glycoproteins of blood cells and plasma.", p. 245.

Neuraminidase and regression of solid tumours. *Lancet* **1**, 523, 1972.

Nicolson, G. L. (1971). Difference in topology of normal and tumor cell membranes shown by different surface distribution of ferritin-conjugated concanavalin A. *Nature New Biol.* **233**, 244.

Nossal, G. T. V. (1972). Summary of the third International Congress of the Transplantation Society: a personal approach. In: "Transplantation Today". Balner H., et al., ed., Grune and Stratton N. Y., p. 967.

Oettgen, H. F., Old, L. J. and McLean, (1968). Delayed hypersensitivity and transplantation immunity

elicited by soluble antigens of chemically induced tumors in inbred guinea pigs. *Nature* **220**, 295.

Oikawa, T., Yanagimachi, R. and Nicolson (1973). Wheat germ agglutinin blocks mammalian fertilization. *Nature* **241**, 256.

Okada, S. and O'Brien, J. S. (1969). Tay-Sachs disease: Generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science* **165**, 698.

Old, L. J. and Boyse, E. A. (1973). Current enigmas in cancer research. In: ''Harvey Lectures 1971—1972'', p. 273.

Olsnes, S., Refsnes, K., and Pihl, A. (1974). Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* **249**, 627.

Östberg. L. Lindblom, J. B. and Peterson, Per A. (1974). Subunit structure of HL-A antigens on cell surface. *Nature* **249**, 463.

Ozanne, B. and Sambrook, J. (1971). Binding of radioactively labelled concanavalin A and wheat germ agglutinin to normal and virus transformed cells. *Nature New Biol.* **232**, 156.

Painter, R. H., Yasmeen, D., Assimeh, S. W. and Poulik, M. D. (1974). Complement fixing and macrophage opsonizing activities associated with β-2-microglobulin. *Immun. Communic.* 3, 19.

Palm, J., Heynes, S., and Brinster, R. L. (1971). Differential immunofluorescence of fertilized mouse eggs with H-2 and non-H-2 antibody. *J. Exp. Med.* **133**, 1282.

Pardoe, J. I., Uhlenbruck, G. and Reifenberg, U. (1971). Structural studies of red cells: Immunochemistry of the M, N and related antigens and of the myxoviral receptors. *Med. Lab. Tech.* 28, 255.

Peterson, P. A., Rask. L. and Lindblom, J. B., (1974). Highly purified papain-solubilized HL-A antigens contain β-2-microglobulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 35.

Peterson, P. A., Rask, L., Sege, K., Klareskog, L. Anundi, H. and Östberg, L. (1975) Evolutionary relationships between immunoglobulins and transplantation antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U S. A.) **72**, 1612.

Poulik, M. D., Bernoco, M., Bernoco, D. and Ceppelli R. (1973). Aggregation of HL-A antigens at the lymphocyte surface induced by antiserum to β-2-microglobulin. *Science* **182**, 1352.

Prat, M., Tarone, G. and Comoglio, P. M. (1975). Antigenic and immunogenic properties of membrane proteins solubilized by sodium deoxycholate papain digestion or high ionic strength. *Immunochem* **12**, 9.

Preece, A. W. and Light, A. (1974). The macrophage electrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease. Further clinical investigations and studies on macrophage slowing factor. *Clin Exp. Immunol.* **18**, 543.

Pritchard, J. A. V., Moore, J. L., Sutherland, W. H. and Joslin, C. A. F. (1972). The macrophage electrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease: An independent confirmation. Lancet ii, 627.

——————— (1973). Evaluation and development of the macrophage electrophoretic mobility (MEM) test for malignant disease. *Brit. J. Cancer*. **27**, 1.

Rask. L., Lindblom, J. B. and Peterson, P. A. (1974). Subunit structure of H-2 alloantigens. *Nature* **249**, 833.

Reisfeld, R. A. and Kahn, B. D. (1970). Transplantation antigen. *Adv. Immunol.* **12**, 117.

Reisfeld, R. A. (1972). Human histocompatibility antigens. In: ''Comtemporary Topics on Immunochemistry'', p. 51.

Reisfeld, R. A. and Kahn, B. D. (1972). The molecular nature of HL-A antigens. In: ''Transplantation Antigens'', p. 489.

Reyes, F., et al. (1974). Human normoblast A antigen seen by immunoelectron microscopy. *Nature* **247**, 461.

Robertson, J. D. (1966). Design principles of the unit membrane In: ''Principles of Biomolecular Organization'', Ciba Found. Symp. p. 357.

Rosenblith, J. Z., at al. (1973). A comparative evaluation of the distribution of concanavalin A binding-sites on the surfaces of normal, virally-transformed and protease-treated fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 1625.

Sanderson, A. R., Cresswell, P. and Welsh, K. I. (1971). Involvement of carbohydrate in the immunochemical determinant area of HL-A substances. *Nature New Biol.* **230**, 8.

Sela, B. A., Lis, H., Sharon, N. and Sachs, L. (1971). Quantitation of N-acetyl-D-galactosamine-like sites on the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. *B. B. A.* **249** 564.

Shier, W. T. (1971). Preparation of a ''chemical vaccine'' against tumor progression. *Proc. Nat. Acad Sci.* **68**, 2078.

Silver, J. and Hood, L. (1975). An approach to amino acid sequence analysis of transplatation antigens. *Nature* **256**. 63.

Silver, J. and Hood, L. (1976). Structure and evolution of transplantation antigens: Partial amino acid sequences of H-2K and H-2D alloantigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**, 599.

da Silva, P. P., et al. (1971). Localization of A antigen on human erythrocyte ghosts. *Nature* **232**. 194.

Skutelsky, E., Marikovsky, Y. and Danon, D. (1974). Immunoferritin analysis of membrane antigen density: A. Young and old human blood cells. B. developing erythroid cells and extruded erythroid nuclei. *Europ. J. Immunol.* **4**, 512.

Smith, R. W., Morganroth, H. and Mora, P. T. (1970). SV40 virus-induced tumor specific transplatation antigen in cultured mouse cells. *Nature* **227**, 141.

Solheim, B. J. and Thorsby, E. (1974). β-2-microglobulin is part of the HL-A molecule in the lymphocyte membrane. *Nature* **249**. 36.

Snary, D., Goodfellow, P. and Hayman, M. J. (1974). Subcellular separation and molecular nature of human histocompatibility antigens (HL-A). *Nature* **247**, 457.

Springer, G. F., Huprikar, S. V. and Tegtmeyer, H. (1971). The biochemical and genetic basis of human blood group MN specificities and their relations to infectious mononucleosis and oncogenic virus-receptors. In: "Glycoproteins of blood-cells and plasma", p. 35.

Springer, G. F., Huprikar S. V. and Adye, J. C. (1972). Antibody-virus and endotoxin-receptors of human erythrocyte membrane. In: "Cellular Antigens", p. 133.

Springer, T. A. Strominger, J. L. and Mann, D. (1974). Partial purification of detergent-soluble HL-A antigen and its cleavage by papain. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.)* **71**, 1539.

Springer, T. A. and Strominger, J. L. (1973). Detergent solubilized HL-A antigen from human cultured lymphocyte *Fed. Proc.* **32**, 1018.

Schwartz, B. D., Kato K., Cullen, S. E. and Nathenson, S G. (1973). H-2 histocompatibility alloantigens. Some biochemical properties of molecules solubilized by NP-40 detergent. *Biochemistry* **12**, 2157.

Tanigaki, N., Katagiri, M., Nakamuro, K., Kreiter, V. P. and Pressman, D., Common antigenic structures of HL-A antigens. II. Small fragments derived from papin-solubilized HL-A antigen molecules. *Immunol.* **26**, 155.

Taylor, R. B., Duffus, W. P. H., Raff, M. C. and de Petris, S. (1971). Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.* **233**, 225.

Terhorst, C., Parham, P. Mann, D. L., and Strominger, J. L. (1976). Structure of HLA antigens: Amino-acid and carbohydrate compositions and NH_2-terminal sequences of four antigen preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **73**, 910.

Thieme, T. R. Raley, R. A. and Fahey, J. L. (1974). Demonstration of molecular individuality of HL-A antigens, *J. Immunol.* **113**, 323.

Tomita, J. T., Safford, J. W. and Hirata, A. A. (1974) Antibody response to different determinants on carcinoembryonic antigen (CEA). *Immunol.* **26**, 291.

Tomita, M. and Marchesi V. T. (1975). Amino acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **72**. 2964.

Turberuille C., et al. (1973). Studies on carcinoembrryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein. CCEA-2. Preparation and chemical characterization. *Immunochem.* **10**, 841.

Tyler, A. (1955). Gametogenesis, fertilization and parthenogenesis. In: "Analysis of Development", ed Willier, B. H., et al., Saunders, Philadelphia, p. 170.

Vitetta, E. S., Capra, J. D., Klapper, D. J., Klein J. and Uhr, J. W. (1976). The partial amino-acid sequence of an $H\text{-}2^k$ molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S A.) **73**, 905.

Vojtiskova, M. (1969). $H\text{-}2^d$ antigens on mouse spermatozoa. *Nature* **222**, 1293.

Wachtel, S. S., et al. (1974). Serological cross reactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**. 1215.

Watkins, W. M. (1972). Blood-group specific substances. In: "Glycoproteins: their composition, structure and function". ed. Gottschalk A. Part B., p. 830.

Winzler, R. J. (1972). Glycoproteins of plasma membranes. Chemistry function. In: "Glycoproteins: their composition, structure and function", ed. Gottschalk, A., Part B., p. 1268.

Yahara, I. and Edelman, G. M. (1972). Restriction of the mobility of lymphocyte Ig receptors by concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 608.

第五章　影响对抗原起反应的因素

动物对抗原的免疫反应不只是决定于抗原的化学结构，而且还受到其他许多因素的影响。首先，对一定抗原的免疫反应决定于动物的反应能力，即遗传性和生理状态。另一方面，对于有反应能力的动物，免疫反应还受到抗原引入途径、剂量和佐剂的很大影响。

一、佐剂和佐剂作用原理

和抗原一起注射时，能增加抗原的免疫原性，或改变免疫反应的类型的物质，称为佐剂（Adjuvant）。

佐剂能起几方面的作用：1）把显然无免疫原性的物质转变为有效的免疫原；2）增加循环抗体水平，或产生更为有效的保护免疫性；3）改变产生的循环抗体的类型；4）增加细胞中介的超敏反应；5）产生实验性自身免疫病，如过敏性脑脊髓炎。

已经知道有佐剂作用的物质是多种多样的，包括细菌内毒素、藻朊酸、皂素、羊毛脂、甲基纤维素、维生素 C、硅以及微生物及其产物（如百日咳疫苗、小棒状杆菌、链球菌内毒素和分枝杆菌等）。其作用方式也是不同的，有的起物理吸附作用，有的起更为复杂的、专一的作用。关于这方面的一般资料可参看 White（1972），Jollis 和 Parab（1973）的专著。

（一）物理吸附

如前所述，小分子量的可溶性抗原或半抗原，经胶体颗粒吸附后可获得产生抗体的能力或提高产生抗体的量。最常用的是氢氧化铝吸附法：含 30 毫克硫酸铝钾的溶液和 150 毫克蛋白质混合，再用稀 NH_4OH 中和，新生成的氢氧化铝可吸附大量蛋白质共同沉淀，而成为聚集状态的颗粒抗原，由此增加巨噬细胞对它们的吞噬活动，或改变在淋巴器官内阻留的部位，从而获得或提高免疫原性。免疫学实验上，更常使用的是几种成分配合起来的复合佐剂。

（二）复合佐剂——Freund 佐剂。佐剂安全性的改进

Freund（1951）把抗原和石蜡油混合，借助乳化剂（羊毛脂或 Arlacel A）的作用，研磨成为一种油包水（W/O）的乳液。通常在注射一、二次后，就可能产生效价高而持久的抗体。这种佐剂称为 Freund 不完全佐剂（石蜡油＋乳化剂）。如果在不完全佐剂内，再加死的分枝杆菌（*Mycobacterium*），如人结核杆菌（*M. tuberculosis*）或卡介苗（B. C. G），还可能再增高抗体效价，并且引起迟发型超敏反应（图 5-1）。这种佐

剂称为 Freund 完全佐剂(石蜡油＋乳化剂＋分枝杆菌)。

Freund 佐剂的作用还依赖注射途径。对一般实验动物说来，足掌或皮内注射效果最好。如家兔,足掌或皮内注射能诱发过敏性脑脊髓炎,而腹腔内或皮下注射则不能。豚鼠足掌注射脑组织抗原和 Freund 完全佐剂一小时后，切除该足,也能出现脑脊髓炎。这可能是由于在这一短暂时间内已经有足够量的脑抗原和佐剂，经过淋巴管分布到体内。皮内注射效果较好，可能是由于这一部位小淋巴管的分布较多，易于进入引流淋巴结。

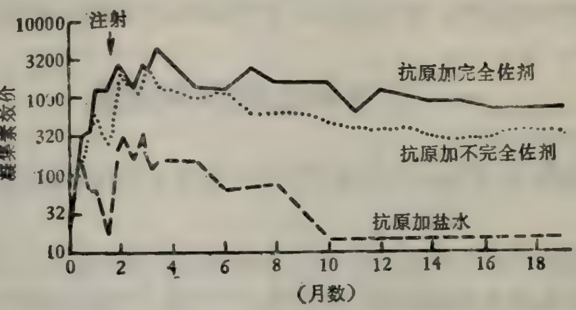


图 5-1 Freund 完全佐剂和不完全佐剂对于家兔在皮下接种伤寒杆菌后所呈现的凝集效价的加强作用(据 Carpenter, 1956)。

注射 Freund 完全佐剂后,注射部位经常出现肉芽肿和持久的溃疡。组织学上,注射部位局部有巨噬细胞、上皮状细胞、淋巴球和浆细胞聚集成团。动物经病理学检查发现肺、肝、肾、肌肉等器官都有散在的肉芽肿。同时,淋巴结增重,淋巴器官(淋巴结、脾脏等)内浆细胞广泛增生。除去主要由分枝杆菌引起的毒性作用外，乳化剂甘露酐单油酸酯(Arlacel A) 易被体内酯酶水解，释放出的游离的油酸也能造成组织的损伤 (Berlin 和 Wyman，1971)。由于这种毒性作用，Freund 佐剂在临床上(如肿瘤免疫治疗)应用时,对病人增加不少痛苦。

近来，发展了一种比较安全的佐剂，即佐剂 65 (花生油，单硬脂酸铝和 Arlacel A)。这种佐剂当和流感疫苗共同使用于预防接种时，在提高抗体水平和持续时间方面都取得很好的效果,并能在安全范围内在人体使用,只引起很轻的炎症反应。据报告 504 例使用五年以上,未发现全身或局部不利影响。这种佐剂可以很快地代谢,从组织内排除出去 (Woodhour 等，1964；Peak 等，1964；Weibel 等，1970)。当佐剂 65 加入双链多聚核苷酸 (Poly I:C 或 Poly A:U) 时，佐剂作用还要加强很多 (Woodhour 等，1969)。佐剂 65 对细胞免疫有无促进作用，还不清楚。

人工合成双链多聚核苷酸 (Poly A:U) 或 Poly C 和甲基化 BSA 络合物，都能加强细胞抗原和颗粒抗原引起的免疫反应。免疫动物的脾脏内浆细胞早期增加的速度加快。这可能是由于核苷酸激酶活力加强的结果 (Braun 和 Nakano，1967)。从卡介苗提取出的 RNA，人工合成的 Poly A:U 都能促进 T 细胞群的增生，并在豚鼠能帮助抗原诱发实验过敏性脑脊髓炎 (Gumbiner 等，1973；Paterson 和 Drobish，1974)。自体免疫病发病学说中，病毒潜伏或持续存在，常被认为是诱发自体免疫反应的关键。近来在某些全身性红斑狼疮病人血液中发现有双链 RNA 存在。病毒双链 RNA 作为天然

佐剂，在诱发自体免疫病中所起的作用是值得注意的。人工合成双链多聚核苷酸，虽然对体液免疫和细胞免疫都有促进作用，但在动物毒性实验上表现较显著的毒性作用。因此其安全性仍是没有保证的（Beers 和 Braun，1970）。

鉴于佐剂对于加强免疫反应、调节免疫反应的类型和诱发实验性自身免疫病等方面的作用，实践上对安全佐剂的迫切需要，以及卡介苗作为非专一佐剂在肿瘤免疫治疗上有一定价值（Simmons 和 Rios，1971；Zbar 等，1972；Marx 和 Rios，1974），佐剂作用原理，特别是分枝杆菌有效成分的分离、纯化和佐剂作用的研究，近年来受到相当大的注意。

（三）佐剂作用原理

有佐剂作用的物质是多种多样的，它们的一个共同性质就是表面活性。对于脂肪族含氮化合物的系统地研究表明，佐剂活力必须同时具备两个条件：化合物必须是碱性的和含有长的烃链。如二甲基胍的同系物，佐剂活性从 10 碳原子链长开始出现，12 碳时迅速增高，此后增加减慢（Gall，1966）。许多种能使溶酶体的膜不稳定，从而释放出内含的水解酶的物质，同时也具有佐剂活力。如维生素 A，内毒素（脂多糖），百日咳菌，硅颗粒等都可能通过这一机制（影响巨噬细胞活动）而起作用（Spitznagel 和 Allison，1970）。

Freund 不完全佐剂中，蛋白质抗原存在于油包水（W/O）乳液的水相内就能产生显著的佐剂效应。如果油相内再加分枝杆菌更可以大大加强这种效应。因此，其作用是多方面的。可分别从胶体化学方面和细菌专一作用等方面，加以讨论。

1. 胶体结构稳定性的作用

Freund 不完全佐剂（不加分枝杆菌）的作用是由于在某些乳化剂（Arlacel A 或羊毛脂）的作用下，能形成稳定的油包水乳液。蛋白质抗原存在于水相内，因而能保持长期的、缓慢的释放。乳液稳定性与其粘度有密切关系。对乳液结构的电子显微镜观察表明，粘度大的乳液（流速为 1—3 分钟/0.1 毫升），具有很稳定的三维网状构造，含抗原的水相分散在油相内，呈细丝状。如果油相内加分枝杆菌，只有当细菌被邻近的水滴包被时，才能呈现典型的完全佐剂效应。如用吐温 80 作乳化剂，形成水包油（O/W）乳液，则无佐剂效应。其次，即使乳液粘度较低，只要分枝杆菌和水相保持大量接触，就能产生很好的佐剂效应。因此，完全佐剂的胶体结构所起的作用是使水溶性抗原和分枝杆菌保持稳定而密切的接触，由此产生类似分枝杆菌本身的抗原——结核菌素引起的免疫反应（据 Dvorak 和 Dvorak，1974）。反之，当用分枝杆菌的一种有效成分糖脂（P_3）作为佐剂时，蛋白质抗原只有存在于水包油（O/W）乳液状态，才能诱发迟发型超敏反应和肉芽肿。抗原加 P_3 和 Freund 不完全佐剂混合形成油包水乳液时，就不表现佐剂效应。因此，抗原和 P_3 乳液的物理状态（位于油滴内或表面）似乎对于免疫原性有重要的作用（Granger 等，1976）。

Freund 不完全佐剂，由于具有稳定的油包水胶体结构，还能起以下几种作用：

1）延迟抗原在局部的破坏并保持缓慢释放。如志贺氏杆菌抗原参入油包水乳液中，

注射后可保持 22 周；

2）引流淋巴结内，产生抗体的细胞增多；这可能是由于抗原和淋巴结内细胞接触时间延长，或抗原分子在乳化时物理状态改变(聚集)。

总之，油包水乳液中抗原能保持很长久的时间，缓慢释放，并易于进入淋巴管。而其他种类佐剂，如明矾沉淀的抗原很快就被结缔组织包围，不易对抗体形成系统起刺激作用。

最后，还应考虑一个问题，Freund 完全佐剂乳化过程中是否会使蛋白质抗原变性。这对于借助 Freund 完全佐剂诱导抗体来研究蛋白质抗原构象的可靠性是有决定意义的。有人应用顺磁共振（EPR）直接观察乳液中的蛋白质，证明血红蛋白在乳化过程中，或在乳液状态放置 24 小时（4°C）（相当于通常免疫前的操作条件）都没有变性（Berzofsky 等，1976）。

2. 细菌的专一作用

Freund 不完全佐剂内加人分枝杆菌后，所引起的免疫反应发生很大的质的变化：促进迟发型超敏反应的出现或加强；合成不同类型的免疫球蛋白。如豚鼠用卵白蛋白单独注射主要引起 IgG 抗体，而加 Freund 完全佐剂时，主要产生 IgM 抗体。IgM 的增加和迟发型超敏反应强度有平行的关系。并易于引起实验过敏性自身免疫病，如脑脊髓炎和睾丸炎，或"佐剂病"。诱发强的迟发型超敏反应是分枝杆菌，以及其他几种细菌，如小棒状杆菌（*Corynebacterium parvum*）的独特的作用。其他大多数佐剂一般能促进抗体产生，但不能同时促进迟发型超敏反应。

3. 分枝杆菌有效成分的分离、纯化

从 50 年代起，曾作过许多努力来分离分枝杆菌的有效成分。最早得到的有效制品，如 D 蜡是一种短肽糖脂（Peptidoglycolipid）。其化学组成的特点是类脂部分含有独特的分枝杆菌酸（Mycolic acid），一种叉链的β-羟酸；同时还含有为细胞壁之短肽聚糖（Peptidoglycans）所特有的氨基酸（丙氨酸、谷氨酸、m-二氨基庚二酸）。当时有人认为这种特殊的分子构造可能满足 Gall（1966）所设想的表面活性的要求。

最近几年，这方面的工作获得迅速的进展。Adam 等（1972）借助溶菌酶，首先从一种分枝杆菌（*M. smegmatis*）细胞壁分离出一种水溶性大分子，是由细胞壁短肽聚糖和阿拉伯-半乳聚糖相连构成。当把它加到 Freund 不完全佐剂内，它能完全代替分枝杆菌起加强体液免疫和引起细胞免疫的作用，同时不呈现毒性（Chedid 等，1972）。其他作者用不同方法，也得到类似的水溶性有效成分（Hiu，1972；Migliore-Samour 和 Jolles，1972）。后来，又从一种人结核杆菌（H37Ra）的脱脂细胞壁提出一个水溶性佐剂有效成分，化学性质为一个 4 糖-7 肽。用 33 微克髓鞘碱性蛋白抗原加 12.5 微克这种佐剂有效成分，就能在豚鼠诱发典型的脑脊髓炎（Westall 等，1975）。此外，从一种结核杆菌（DT）的培养液中，也能提取出大量的无毒性的有佐剂活性的成分，为一种水溶性的糖多肽（Stewart-Tull 等，1975）。

对于分枝杆菌的水溶性佐剂成分的进一步分析，还发现不含中性糖的短肽聚糖也有同样的佐剂作用（Adams 等，1973）。后来，更进一步证明最小的有效片段是一个双糖

4 肽（I）：

N-乙酰氨基葡萄糖 —β1—4→ N-羟乙酰胞壁酸
(N-glycolymuramic acid)
|
L-丙氨酸
|
D-谷氨酸—α—NH_2
|
m-二氨基庚二酸—NH_2
|
D-丙氨酸

双糖 4 肽（I）（细胞壁短肽聚糖亚基）的构造

它相当于细胞壁短肽聚肽的亚基，能提高对卵白蛋白的循环抗体，并引起迟发型超敏反应（Adam 等，1974）。此外，从革兰氏阴性细菌（如大肠杆菌）和革兰氏阳性细菌（如 *Streptococcus faecalis*, *Lactobasillus casei* 和 *S. epidermidis*），也都能得到结构类似的具有佐剂活力的化合物。可见，这类物质不限于在抗酸性细菌中存在。这些化合物和分枝杆菌双糖 4 肽（I）在结构上的唯一差别是在大肠杆菌中，N-羟乙酰胞壁酸（N-glycolymuramic acid）被乙酰胞壁酸（Acetylmuramic acid）代替，D-谷氨酸和 m-二氨基庚二酸不氨基化；而在革兰氏阳性细菌中，m-二氨基庚二酸则被 L-赖氨酸代替（Nauciel 等，1974）。再进一步分析佐剂活力和短肽聚糖分子结构的关系，发现大肠杆菌（*E. coli*）之短肽聚糖去除双糖后的短肽片段，也能保持原分子的佐剂活力（表 5-1）。因此，短肽 L-Ala-D-Glu-R3-D-Ala（其中 R3 为 m-二氨基庚二酸或 N^6 取代的 L-Lys），似乎可能是代表佐剂活性的最小构造。很可能具有这种特殊结构的短肽在动物细胞内很难被分解，并因之而起佐剂作用（Fleck 等，1974）。

表 5-1　细菌完整短肽聚糖（peptidoglycan）及其片段之佐剂活力

微克	完整肽聚糖，提取自				*E. coli* 肽聚糖片段			
	E. coli	*S. faecalis**	*L. casei**	*S. epidermis***	双糖肽单体	肽双体	肽单体	双糖
100				4/4(16)	3/3(14)			
50	4/4(15)	6/7(12)	6/7(12)		4/4(12)			
10	4/4(14)				3/4(13)	7/18(16)	3/4(13)	0/4
1	2/4(13)				6/8(12)	7/8(14)		
0.1	0/4				1/4	1/4		
0.01						0/4		
0	0/10							

*将细胞壁物质加入到偶氮苯砷酸-N-乙酰-L-酪氨酸溶液中。此混合物加等体积 Freund 不完全佐剂乳化。豚鼠足掌注射 0.2 毫升乳液，含有 2×10^{-7} 克分子抗原和表内指明剂量的佐剂。致敏 12 天后，用 10 微克偶氮苯砷酸-豚鼠血清白蛋白作皮试。24 小时后观测，皮肤反应超过直径 8 毫米为阳性。结果用阳性动物数和实验动物总数的比值表示，括弧内数字为皮肤反应的平均直径。

4 肽单位的基本分子构造如下：

* L-Ala-D-Glu(NH_2) ┌—L-Lys-D-Ala
ε |
D-Asp(NH_2)

** L-Ala-D-Glu(NH_2) ┌—L-Lys-D-Ala
ε |
$(Gly)_4$, L-Ser

（据 Fleck 等，1974）。

最近，还合成了一个含糖短肽，N-acetylmuramyl-L-丙氨酸-异谷氨酰胺，在水溶液内(代替油包水乳剂)就能起促进体液抗体的佐剂作用。当此化合物中的 L-丙氨酸改变为 D-丙氨酸时，免疫反应就被抑制 (Chedid 等，1969)。

细菌佐剂有效成分具有无毒性的优点。这一发现为研制用于人体的安全佐剂准备了条件。

4. 细胞学机制

分枝杆菌及其有效成分的生物学作用的特点是刺激组织内巨噬细胞的增生。注射局部出现一个包含类上皮细胞，巨噬细胞的肉芽肿。局部淋巴结内巨噬细胞广泛增生。在小鼠造成引流淋巴结付皮质(胸腺依赖)区域扩大，注射第四天时此区域出现类淋巴母细胞，然后出现生发中心和髓部浆细胞的增生 (Taub 等，1970)。这些事实提示分枝杆菌的作用可能主要是影响巨噬细胞，并刺激 T 细胞群的增生，从而促进迟发型超敏反应。

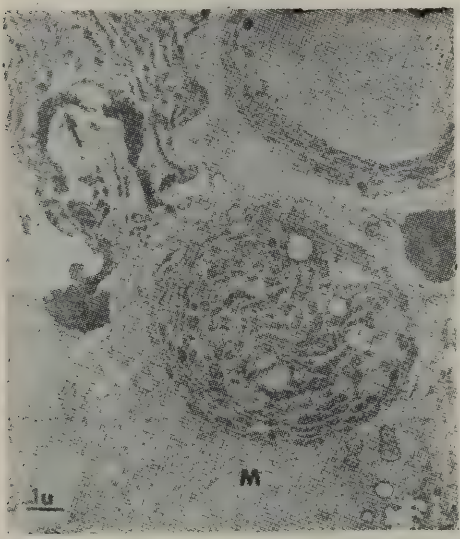


图 5-2 含抗过氧化物酶抗体的一个浆细胞被巨噬细胞吞噬，包围在吞噬体内。另外两个合成抗体的浆细胞和巨噬细胞的细胞膜贴近，其中一个浆细胞的高尔基体内有过氧化物酶反应(箭头)。深色物质(D)可能是 Freund 佐剂(据 Miller 和 Avrameas, 1971)。

要了解佐剂如何调节免疫反应问题，首先应知道哪些细胞参与佐剂影响的免疫反应过程。早期的工作认为佐剂首先是影响巨噬细胞。佐剂和抗原经巨噬细胞吞噬处理后，再注射到其他动物，引起的免疫反应大大加强。目前已经知道，对于大多数抗原，形成抗体需要 T 细胞和 B 细胞间的配合。Allison 和 Davies (1971)用实验方法造成缺乏 T 细胞的小鼠。这样的动物，当注射 BSA 和 Freund 完全佐剂时，佐剂对免疫反应的促进作用便明显地减弱。如果再移植胸腺组织到这些动物，佐剂促进抗体产生的作用又表现出来了。由此可见，佐剂的促进作用需要 T 细胞的参加。鉴于佐剂可能最先作用于巨噬细胞，有人假定佐剂可能加强巨噬细胞对 T 细胞的影响，刺激 T 细胞增生，进一步促进 T 细胞和 B 细胞的相互作用，从而加强抗体的产生。电子显微镜观察发现含有 Freund 完全佐剂的巨噬细胞与淋巴细胞，和正在产生抗体的浆细胞之间有紧密的接触，也支持这一看法 (Miller 和 Avrameas, 1971) (图 5-2)。

BCG 非专一地促进肿瘤免疫的机制，至少部分可能是通过巨噬细胞刺激 T 杀伤细胞。全身注射 BCG的小鼠，其脾脏细胞产生的淋巴球激活因子比正常小鼠增高 2—3 倍，明显地刺激 T 细胞在离体条件下表现的杀伤作用 (Mitchell 等，1973)。此外，也有证据表明 BCG 还可能直接加强巨噬细胞本身对瘤细胞的杀伤作用 (Evans 和 Alexander, 1972)。

Freund 完全佐剂还能改变两种以上的抗原混合物引起的抗体的比例。这可能是由于佐剂刺激 T 细胞，加强某一抗原成分的竞争作用，从而改变免疫反应的专一性 (Tau-

ssig，1974）。这一问题将留待后面谈抗原竞争作用时再一起讨论。

总之，佐剂的作用机制是十分复杂的，涉及到抗原的选择性分布，巨噬细胞活动，免疫活性细胞间的相互作用等细胞免疫学理论问题。因此，目前对这一问题了解的深度还难免不受到对这些问题的认识程度的限制。

二、动物的反应性

任何免疫反应都是动物体对抗原反应的结果。免疫反应不能不受到动物的遗传性、发育时期和生理状态等整体因素的影响。由于本书范围的限制，这里只能作非常简略的讨论。

（一）遗 传 性

对于同一种抗原，不同物种，不同品系，甚至不同个体（如人类对应变原的敏感性）产生免疫反应的能力都不同。例如，品系 13 豚鼠对胰岛素的某些决定簇起反应，而品系 2 豚鼠则不能。反之，品系 2 豚鼠能对 DNP-多聚-l-赖氨酸的 DNP 决定簇起免疫反应，而品系 13 则不能。这种反应能力的差别是遗传的，受一个显性基因控制。

苯甲酰青霉素（Bp）蛋白质，偶氮蛋白质对这两个品系都能引起免疫反应。然而，Bp-多聚-l-赖氨酸或偶氮-多聚-l-赖氨酸却只能在品系 2 引起抗体产生。这两类抗原的半抗原相同，差别只是载体不同。因此，抗体的产生主要依赖于动物对载体蛋白质的反应性。

目前认为免疫反应性的遗传是受两类免疫反应基因（Ir genes）控制的。T 细胞对抗原载体决定簇的识别是受和组织相容性基因连锁的 Ir 基因控制的；而 B 细胞对抗原的半抗原决定簇的识别是受和免疫球蛋白同种异型基因连锁的 Ir 基因控制的。这些基因分别地决定 T 细胞和 B 细胞表面受体的构造（McDevitt 和 Landy，1972）。

（二）抗原竞争现象

当一个动物注射两种或两种以上的抗原时，它们引起的抗体的量通常是不相等的，一种抗原可能抑制对另一种抗原的反应。这一现象称为抗原竞争（Antigenic competition）。如家兔的球蛋白和白蛋白分别注射到小鼠，都能引起很强的抗体反应。但是，将此两种抗原混合注射时，产生的抗球蛋白抗体占绝对优势（95%），而抗白蛋白抗体的产生则受到显著的抑制。

品系 13 豚鼠对多聚-l-赖氨酸无反应性。对兔血清白蛋白（RbSA）则有反应性，能产生抗 RbSA 抗体。当多聚-l-赖氨酸和兔血清白蛋白混合注射时，结果抗 RbSA 和抗多聚-l-赖氨酸抗体都不能产生。显然，这同样可能是由于抗原竞争在这里起作用。多聚-l-赖氨酸的存在抑制了抗 RbSA 抗体的形成。

同一个蛋白质分子被两个半抗原取代[如蛋白质分子的 lys 残基上连接 DNP-基团，Tyr. 或 Hist. 残基上连接 P-偶氮苯砷酸（Ars）基团]。当把这种抗原注射到动物体内

时，也出现抗原竞争现象，结果只形成抗-DNP 抗体，而不形成抗-Ars 抗体。如果注射 DNP-蛋白质和 Ars-蛋白质的混合物时，两半抗原各位于一个载体分子上，就能同时产生两种抗体。显然，只有当两个半抗原位于同一载体分子上并和同一细胞起反应时，DNP 基团才能抑制抗-Ars 抗体的产生。

抗原竞争现象对于了解抗原在抗体形成中所起的作用，可能是一个重要的线索。可是，对这一现象产生的机制，一直不清楚，直到 Radovich 和 Talmage (1967) 发现经 X 射线照射的寄主，接种脾脏细胞愈多，产生的抗原竞争现象愈强，这才开始找到了线索。进一步研究还发现，在继承性免疫传递实验里，把同基因型的淋巴球接种到一个存在抗原竞争的寄主环境内，这些细胞的抗体形成便受到抑制。抗原竞争现象依赖胸腺的存在。小鼠切除胸腺后，便不能表现出抗原竞争现象。如果这些去胸腺的小鼠再输入胸腺细胞时，随着输入细胞数量的增加，抗原竞争程度也增加 (Gershon 和 Kondo, 1971)。此外，非专一的 T 细胞刺激物也能引起类似抗原竞争的效应。当有 Freund 完全佐剂存在时，对两种抗原混合物的抗体反应专一性发生显著的改变。如用家兔球蛋白和白蛋白，不加佐剂注射到小鼠，所产生的抗体中 95% 为抗球蛋白抗体，5% 为抗白蛋白抗体。加 Freund 完全佐剂后，两种抗体的比例就发生明显的变化。这时约 40% 抗体为抗球蛋白抗体，60% 为抗白蛋白抗体。这在很大程度上是由于抗球蛋白抗体的产生受到了抑制。已知 Freund 完全佐剂本身对单独注射球蛋白一种抗原的免疫反应，没有抑制影响。并且如前节所述，Freund 完全佐剂有非专一地激活 T 细胞的作用。因此，它很可能是通过加强 T 细胞活动，从而促进两种抗原的竞争作用，导致抗体反应专一性的改变 (Taussig, 1974)。总之，以上这些实验提示抗原竞争现象是依赖胸腺的，并且可能是受 T 细胞作用下产生的非专一免疫抑制物影响的结果。至于这种非专一的抑制物是 T 细胞本身产生的，还是被 T 细胞激活的巨噬细胞产生的，还有不同的看法。关于抗原竞争现象的详细论述，可参看 Taussig (1973) 和 Gershon (1974) 的专论。

(三) 抗 原 剂 量

抗原剂量对免疫反应的质和量方面都有影响。大多数蛋白质抗原，不加佐剂，注射一次，只能缓慢地引起微弱的抗体反应。通常要经过多次注射才能达到高的抗体水平。对于不同的免疫原，诱导抗体反应所需的最低剂量有很大的差别，如鞭毛素和白喉类毒素只需 0.01—0.1 微克，而 BSA 需要比这一剂量大 1,000 倍。当超过最低剂量的阈值后，随着剂量的增高，达到一个最适抗体反应区，然后又下降，不起抗体反应，即达到高区耐受性 (High-zone tolerance) 或免疫麻痹 (Immunological paralysis)。

对于所有低分子量和中等分子量的可溶性蛋白质(如血清蛋白、核糖核酸酶，白喉类毒素和鞭毛素等)，还可能诱导低区耐受性 (Low-zone tolerance)。也就是说，随着剂量的增加，存在从低区耐受性到最适抗体反应区，再到高区耐受性的过渡。除鞭毛素外，上述其他几种抗原在小鼠上诱导低区耐受性的阈值是相当恒定的，大约在 1.0 微克附近。各种抗原随其免疫原性不同，诱导低区耐受性的条件也不同。一些抗原如牛丙种球蛋白 (BGG)，高速离心去除聚集物后，对小鼠完全没有免疫原性。换句话说，只要超过诱导耐受性所需的阈值，便一直能诱导耐受性。第二类抗原，如白喉类毒素，对于小鼠

只有在免疫抑制状态(如亚致死照射)时，才能诱导低区耐受性。对于正常动物，在小于诱导耐受性剂量，以及整个免疫耐受性剂量范围内都能诱导抗体的形成。 第三类抗原，如牛血清白蛋白(BSA)在低于诱导低区耐受性最小剂量时,什么反应也不发生。 等于或略超过诱导低区耐受性的阈值时,便出现耐受性。剂量继续增加便进人最适抗体反应区。再继续增加，便达到高区耐受性。由于多数抗原属于第二类，即免疫所需的最低剂量远低于低区耐受性的阈值，因此，在通常免疫程序中，不会遇到这类耐受性。不过在受到免疫抑制后，诱导耐受性的可能性就大大增加了。

鞭毛素抗原清楚地表现两个区域的耐受性(图 5-3)。然而,诱导低区耐受性的剂量要比其他抗原低得多。其间的对应关系还不清楚。因此，也有人称之为超低区耐受性。

当抗原剂量达到毫克范围时，总是诱导高区耐受性。低区耐受性可能只影响 T 细胞，而高区耐受性可能影响 T 细胞和 B 细胞。

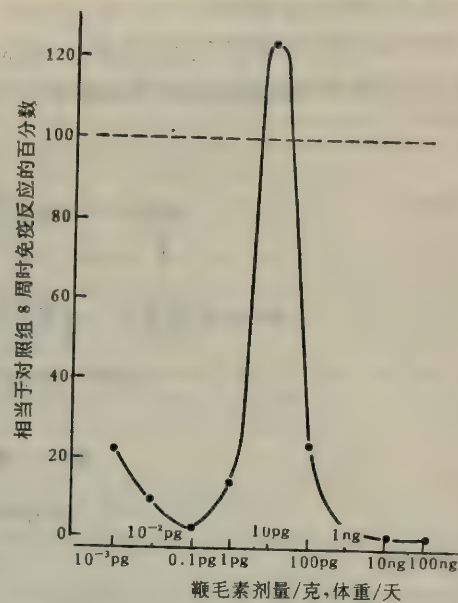


图 5-3 *S. adelaide* 鞭毛素剂量和免疫反应类型的关系,示高区和低区耐受性,用对照组平均效价的百分数表示。实验步骤: 新生大鼠注射 10^{-15}—10^{-7} 克鞭毛素/克体重,连续两周。 在此期间对照组动物只注射盐水。 在第一轮注射停止后，两组所有的大鼠每周两次，注射 10 微克鞭毛素，继续到动物的年龄为10周时为止。年龄为 12 周时,所有动物再注射 10 微克鞭毛素测试(据 Diener, 1970)。

(四) 激　素

激素对免疫反应可能产生两类非专一的影响:

1. 对体液抗体合成速度的影响

垂体肾上腺皮质系统对淋巴组织的构造和功能有很大影响。 长期使用 ACTH 或肾上腺皮质甾体激素都能造成淋巴组织的退化，并抑制抗体形成。然而，对于已免疫的动物,使用小量(生理量)的皮质激素却能使血流内抗体水平暂时升高。 这可能是由于抗体形成细胞被破坏，而释放出细胞内含的抗体的结果。雌激素能促进淋巴细胞增生，因而可能加强抗体形成。生长素和甲状腺素单独或协同地影响淋巴组织的成熟和分化，从而加强抗体的合成。

2. 对细胞免疫的影响

胸腺的内皮细胞分泌的胸腺素 (Thymosin) 能影响细胞免疫反应能力,而不影响体液抗体的合成。这提示可能存在两类依赖胸腺的 T 淋巴球：一类的成熟需要胸腺激素的刺激，但不一定需要位于胸腺内；另一类的成熟必须在胸腺内 (White 和 Goldstein, 1972)。

除激素外，机体的营养状态(维生素、氨基酸等)以及凡能影响一般蛋白合成代谢的因素,也都可能非专一地影响抗体合成速度。

总之，一个抗原诱导的免疫反应的类型和强度受到极其复杂的因素的影响。除抗原本身的理化特性外，在细胞水平还受到剂量、时间、被网状内皮系统阻留或吞噬的能力，和免疫活性细胞受体的亲合力、反应的 T、B 细胞的数量和相互作用，以及免疫反应产物(抗体等)的反馈调节等因素的影响(图 5-4)。在整体水平，还要加上遗传因素，以及发育时期，神经体液系统和营养状态等非专一的因素的影响。

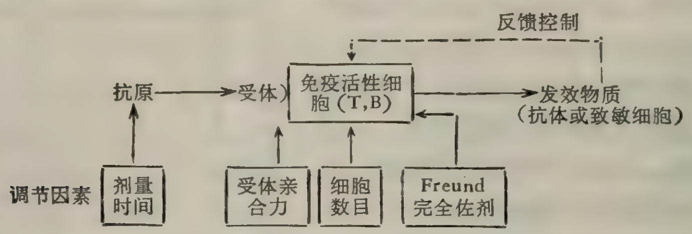


图 5-4 影响抗原诱导的免疫反应的因素。

参 考 资 料

佐剂和佐剂作用原理

专著和综述

Beers, R. F. and Braun W. (1970). Biological effects of polynucleotides. Springer. Berlin.

Jollès, P. and Paraf, A. (1973). Chemical and Biological basis of adjuvants, Springer-Verlag

White, R. G. (1972). Concepts of the mechanism of action of adjuvants. In: "Immunogenicity", ed F. Borek, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, London.

论文

Adam, A., et al. (1972). Isolation and properties of a macromolecular, water-soluble, immuno-adjuvant fraction from the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **69**, 851.

Adam, A., Ciobaru, R., Ellouz F., Petet, J. F. and Ledrer, E. (1974). Adjuvant activity of monomeric bacterial cell wall peptidoglycans. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **56**, 561.

Allison, A. C. and Davies, A. J. S. (1971). Requirement of thymus-dependent lymphocytes for potentiation by adjuvants of antibody formation. *Nature* **233**, 331.

Berlin, B. S. and Wyman, R. (1971). Fractionation of arlacel A (35493). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med,* **136**, 1363.

Berzofsky, J. A., Schechter, A. N. and Kon, H. (1976). Does Freund's adjuvant denature protein antigens? EPR studies of emulsified hemoglobin. *J. Immunol.* **116**, 270.

Braun W. and Nakano, M. (1967). Antibody formation: stimulation by polyadenylic and polycytidylic acid. *Science* **157**, 819.

Chedid, L. et al. (1972). Biological study of a nontoxic water-soluble immunoadjuvant from mycobacterial cell walls. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **69**, 855.

Chedid, L., Audibert, F., Lefrancier, P., Choay, J. and Ledrer, E. (1976). Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**, 2472.

Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F. (1974). Structure of Freund's complete and incomplete adjuvants. Relation of adjuvanticity to structure. *Immunol.* **27**, 99.

Evans, R. and Alexander, P. (1972). Mechanism of immunologically specific killing of tumour cells by macrophages. *Nature* **36**, 168.

Fleck, J., Mock, M., Tytgat, F., Nauceil, C. and Minck, R. (1974). Adjuvant activity in delayed hypersensitivity of the peptid part of bacterial peptidoglycans. *Nature* **250**, 517.

Freund, J. (1951). The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. *Amer. J. Clin. Patho.* **21**, 645.

Gall, D. (1966). The adjuvant activity of aliphatic nitrogenous. *Immunol.* **11**, 369.

Granger, D. L., Yamamoto, K.-J. and Ribi, E. (1976) Delayed hypersensibility and granulomatous

response after immunization with protein associated with a mycobacterial glycolipid and oil droplets. *J. Immunol.* **116**, 482.

Gumbiner, C., et al. (1973). Adjuvanticity of mycobacterial RNA and poly A:U for induction of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *J. Immunol.* **110**, 309.

Hiu, I. J. (1972). Water-soluble and lipid-free fraction from BCG with adjuvant and antitumour activity. *Nature New Biol.* **238**, 241.

Marx, J. L. (1974). Tumor immunology (II): Strategies for cancer therapy. *Science* **184**, 652.

Migliore-Samour, D. and Jolles, P. (1972). A hydrosoluble anjuvant-active mycobacterial ''polysaccharide-peptidoglycan.'' Preparation by a simple extraction technique of the bacterial cells (strain Peurois). FEBS Lett. **25**, 301.

Miller, H. and Avrameas, S. (1971). Association between macrophages and specific antibody producing cells. *Nature New Biol.* **229**, 184.

Mitchell, M. S., et al. (1973). On the mode of action of BCG. *Nature New Biol.* **243**, 216.

Nauciel, C., Fleck, J., Martin, J. P., Mock, M. and Nguyen-Huy, H. (1974). Adjuvant activity of bacterial peptidoglycans on the production of delayed hypersensitivity and on antibody response. *Eur. J. Immunol.* **4** 352.

Paterson, P. Y. and Drobish, D. G. (1974). Adjuvanticity of synthetic polynucleotides for induction of experimental allergic encephalomyelitis in guinea pigs. *J. Immunol.* **113**, 1942.

Peck, H. M., et al. (1964). New metabolizable immunologic adjuvant for human use. 2. Short term animal toxicity tests. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**, 523.

Simmons R. L. and Rios. A. (1971). Immunotherapy of cancer: immunospecific rejection of tumors in recipients of neuraminidase-treated tumor cells plus BCG. *Science* **174**, 591.

Spitznagel, J. K. and Allison, A. C. (1970). Mode of action of adjuvants: retinol and other lysosome labilizing agents as adjunvants. *J. Immunol.* **104**, 119.

Spitznagel, J. K. and Allison, A. C. (1970). Effects on antibody responses to macroph-age-associated bovine serum albumin. *J. Immunol.* **104**, 128.

Stewart-Tull D. E. S., Shimono. T., Kotani, S., Kato, M., Ogawa, Y., Yamamura, Y. and Pearson, C. M. (1975). The adjuvant activity of a non-toxic, water-soluble glycopeptide present in large quantities in the culture filtrate of *Mycobacterium tuberculosis* strain DT. *Immunol.* 29, 1.

Taub, R. N., Krantz, A. R. and Dresser, D. W. (1970). The effect of localized injection of adjuvant material on draining lymph node. I. Histology. *Immunol.* **18**, 171.

Taussig, M. J. (1974). The effect of Freund's complete adjuvant on the specificity of an immune response and its relationship to antigenic competition. Cell. *Immunol.* **11**, 484.

Weibel, R. E., et al. (1970). New metabolizable immunologic adjuvant for human use. X. Long term serologic and clinical follow-up. *Amer. J. Med.* **48**, 464.

Westall, F. C., Thompson, M., Migliare-Samour, and Jolles, P. (1975). Induction of allergic encephalomyelitis using hydrosoluble mycobacterial fractions. *Eur. J. Immunol.* **5**, 504.

Woodhour, A. F., et al. (1964). New metabolizable immunologic adjuvant for human use. I. Development and animal immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**, 516.

Woodhour, A. F., et al. (1969). Hyperpotentiation by synthetic double stranded RNA of antibody responses to influenza virus vaccine in adjuvant 65. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **131**, 809.

Zbar, B., Berstein, I. D. Bartlett, G. L. Hanna, M. G. and Rapp, H. J. (1972). Immunotherapy of cancer: regression of intradermal tumors and prevention of growth of lymph node metastasis after intralesional injection of living Mycobacterium bovis. *J. Nat. Cancer Inst.* **49**, 119.

动物的反应性

Gershon, R. K. (1974). T cell control of antibody production. In: ''Contemporary Topics in Immunobiology,'' V. III, Plenum Press.

McDevitt, H. O. and Landy, M., ed. (1972). Genetic control of immune responsiveness; Relationships to disease susceptibility, Academic Press.

Mitchison, N. A. (1972). Dose, frequency and route of administration of antigen. In: ''Immunogenecity,'' ed. F. Borek, North-Holland Publ. Co., Amsterdam. London.

Radovich, J and Talmage, D. W. (1967). Antigenic competition: cellular or humoral. *Science* **158**, 512.

Taussig, M. J. (1973). Antigenic competition. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **60** 125.

White, A. and Goldstein, A. L. (1972). Hormonal regulation of host immunity. In: ''Immunogenecity,'' ed. F, Borek, p. 334, North-Holland Publ. Co., Amsterdam. London.

第二篇　抗体:结构和功能

抗体是能和相应的抗原专一地结合的蛋白质分子。抗体属于血清 γ-球蛋白类，但并不是所有的 γ-球蛋白都表现抗体的活力。血清 γ-球蛋白在理化性质等方面和抗体十分相似，因而一般假定所有的 γ-球蛋白都可能与适当的抗原结合，不过这样的抗原暂时还未被发现罢了。根据这种看法，于是便把抗体及一些化学构造和抗原性与其有关的蛋白质，总称为免疫球蛋白（Immunoglobulin）。这些有关的蛋白质包括多发性骨髓瘤病人血清中的髓细胞瘤蛋白质（Myeloma protein），尿中的 Bence Jones 蛋白质，以及天然存在的免疫球蛋白的亚基。前者中许多已证明有抗体活力。

人类正常的免疫球蛋白已发现有五类：IgG，IgM，IgA，IgE 和 IgD，担任着不同的免疫学功能。它们的分布不限于血清内，在其他体液，如呼吸道、消化道和生殖道的分泌液以及初乳内都可能存在。血清中的抗体是极其多种多样的免疫球蛋白分子的混合物。抗体的这种高度不均一性增加了研究其化学结构的困难。

抗体是免疫系统的关键分子。它们担负着两类免疫学功能：对抗原的识别功能和效应功能（固定补体，结合细胞，穿过胎盘屏障等），而其最显著的特征是作用的高度专一性。抗体分子如何识别成千上万结构不同的抗原，又如何完成其效应功能？抗体分子的结构和功能的关系，尤其是抗原结合专一性的结构基础，是分子免疫学研究的中心问题。从上世纪末期 Emil von Behring 首先发现抗体以来，抗体的结构和功能的研究经历了几个主要的发展时期。Paul Ehrlich（1906）采用“锁和钥”的假说来解释免疫反应。抗体和对应的抗原之间的结合专一性依赖于两种分子表面构造的互补性，就如同锁和钥的关系一样。空间结构互补的思想对于抗体的研究有深远的影响。其次，Karl Landsteiner（1917）对人工半抗原的研究阐明了抗体能识别抗原分子结构的微小差异，并且证明了对于各种各样的抗原，动物体能相应地产生多种多样的不同专一性的抗体。再一个重要的进展，是在五十年代末期由 Niel Jerne 和 MacFarlane Burnet 提出的获得免疫性的无性繁殖细胞系选择学说（Clonal selection theory of acquired immunity）。这个学说的要点是动物体的免疫活性细胞在和抗原接触以前，就已经具有制造各种抗体分子所需的遗传信息。抗原分子不是诱导抗体形成细胞塑造结构上和它互补的抗体分子，而是选择已经含有能制造在结构上和它互补的抗体分子的遗传信息的细胞，刺激它们增生并产生大量的抗体（图 6-1）。这一学说不但奠定了细胞免疫学的理论基础，而且对抗体分子的结构、遗传和进化的研究有很大的启发。从六十年代初期起，R. R. Porter 和 G. M. Edelman 创始的对抗体分子的两条肽链（重链和轻链）和酶解片段的一级结构的测定，开辟了抗体结构研究的新时期，取得了极其重要的进展。目前已经弄清楚了一种人类髓细胞瘤蛋白质的全部一级结构，它能代表 Ig G 的结构。IgM 的一级结构也已经弄清楚了，其它几类免疫球蛋白化学结构的研究也相继取得不同程度的进展。由于对各类免疫球蛋白的轻链和重链的一级结构测定积累的资料日益增多，对

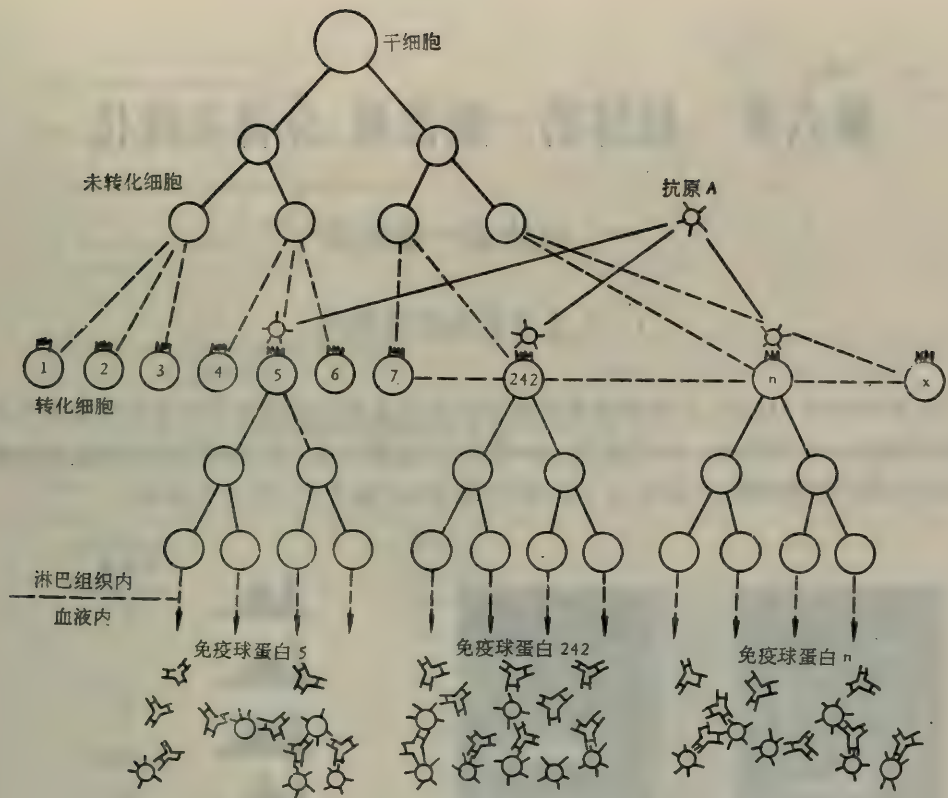


图 6-1　抗体形成的无性细胞繁殖系选择学说(据 Edelman, 1970)。

这些肽链细微结构的比较分析发现了许多奇异的结果。这些结果对于深入了解抗体分子的结构和功能的分化，抗原结合位点的专一性和多样性的结构基础，以及抗体分子合成的遗传控制和进化等，都提供了重要的知识或线索。电子显微镜对抗体分子的直接观察，X 射线晶体分析的结果，也可以和化学结构测定的结果互相印证。目前这方面的研究还在日新月异地蓬勃发展，不断取得新的成果。

对免疫反应的关键分子——抗体构造的深入研究，对于了解一般的分子识别机制，高等动物细胞的基因表现，生物大分子的功能分化、遗传控制和进化等基本生物学问题有密切的关系。因此，在分子生物学中也可以认为抗体是能和遗传信息分子——核酸相提并论的“关键”分子。同时，这些基础理论研究成果也必然会促进对免疫耐受性、器官移植、变态反应、自身免疫病和肿瘤免疫等基本医学问题的认识。如下面将讲到的，IgE 的反应素功能及其作用机制的发现必将促进对变态反应的认识和对变态反应性疾病的控制。

第六章　抗体的一般性质、分离和纯化

一、抗体的一般性质

(一) 人类的免疫球蛋白

在 Tiselius (1937) 发现血清蛋白质在自由电泳场中根据其迁移率区分为四个主要部分(白蛋白，α-球蛋白，β-球蛋白，γ-球蛋白)之后不久，就证明了抗体存在于血清的 γ-球蛋白或迁移较慢的 β-球蛋白 (β_2-或 T-球蛋白) 部分内(图 6-2,6-3)。

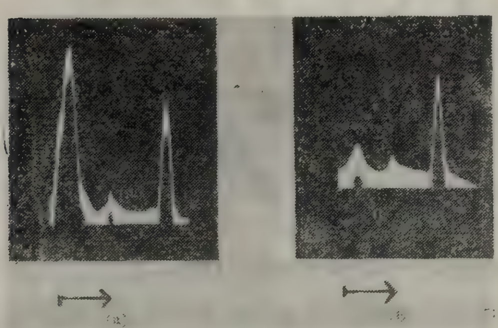


图 6-2　家兔对肺炎链球菌 III 型的抗血清之自由电泳图形。 (a) 加抗原专一地沉淀去除抗体之前； (b) 去除抗体之后，γ-球蛋白部分显著减少。 箭头指示电泳的方向。 最前面的峰是白蛋白。

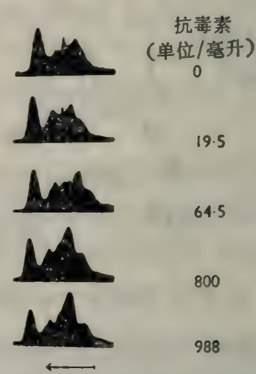


图 6-3　用白喉类毒素免疫后不同时期的马血清之自由电泳图形。当抗体(抗毒素)效价增高时，迁移率较慢的 β-球蛋白(T-球蛋白)也增高。箭头指示电泳的方向。

抗体早期的分类是根据电泳迁移率的不同分为三类。 其中两类属于 β_2-球蛋白：一种分子量大 (约 1,000,000)，称为 β_2 M；另一种称为 β_2 A (分子量约为 150,000)；第三类属于 γ-球蛋白(分子量约 150,000)。六十年代初期流行着一种看法，认为所有的抗体同属于 γ-球蛋白。它们在理化性质上彼此有关系，但在电泳迁移率和分子量上很不均一。因此，当时曾将此三类抗体重新命名为 γ_1 M ($=\beta_2$ M)， γ_1 A ($=\beta_2$ A) 和 γ_2 球蛋白。 后来发现所有抗体都具有四条肽链的基本结构，二条相同的轻链和二条相同的重链，它们又靠链间二硫桥连接起来(图 6-4)。 这种由四条链组成的基本结构(亚基)又可以经共价键连接成多聚体，形成高分子量的抗体，如 Ig M 是由五个亚基组成的(图 6-5)；分泌型 Ig A 是由两个亚基组成的。 各类抗体的轻链的抗原性是相同的(κ 型或 λ 型)，而重链的抗原性则各不相同，分别为 γ-， α-， μ-， δ-， ε-链。除重链和轻链之外，多聚体免疫球蛋白 (Ig M 和分泌型 Ig A)，还含有 J 链。这种基本结构的阐明为免疫球蛋白的合理分类，打下了基础。

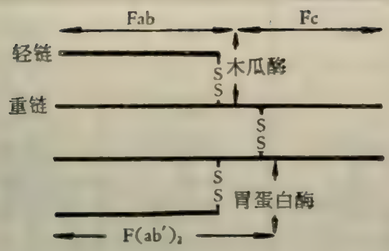


图 6-4 IgG 的四条肽链模型，链间由二硫桥连接。

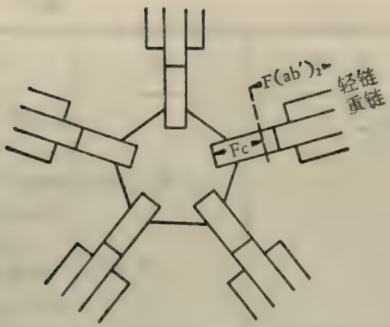


图 6-5 IgM 分子是由五个四条肽链的亚基，经链间二硫键共价连接成的五聚体。

表 6-1 免疫球蛋白及其亚基的命名 (Bull. W. H. O 30: 447, 1964)

物　　质	统 一 名 称*	原 用 名 称
免疫球蛋白	IgG 或 γG	γ, 7Sγ, 6.6Sγ
	IgA 或 γA	γ_1A, β_2A
	IgM 或 γM	γ_1M, β_2M, 19Sγ, γ-巨球蛋白
	IgD 或 γD	
	IgE 或 γE	
链	重链	H, A
	轻链	L, B
重链类别		
IgG	γ 链	
IgA	α 链	
IgM	μ 链	
IgD	δ 链	
IgE	ε 链	
轻链型别	K 或 κ 链	I, B.
	L 或 λ 链	II, A

* 1972 年世界卫生组织人类免疫球蛋白命名会议建议只使用一个符号 Ig，废除使用符号 γ。(据 Bull. W. H.O. 46:67, 1972)。

1964 年世界卫生组织在日内瓦召集的人类免疫球蛋白命名会议，根据各类免疫球蛋白的化学结构，主要是重链抗原性的区别，重新统一命名为免疫球蛋白 M（简称 IgM），免疫球蛋白 A（Ig A）和免疫球蛋白 G（Ig G）。同时，为了读音上的方便，又称为 γM，γA 和 γG。此后，又陆续发现两类新的免疫球蛋白，称为 Ig D（γD）和 Ig E（γE）。相应地，它们各自含有特异的重链，Ig M 含 μ 链，Ig A 含 α 链，Ig G 含 γ 链，Ig D 含 δ 链，Ig E 含 ε 链（表 6-1）。

各类免疫球蛋白的理化性质和生物学特性列于表 6-2 和图 6-6。现简要地说明如下：

1. 免疫球蛋白 G(IgG)

Ig G 在血清免疫球蛋白中含量最高，约占总量的 70%。人 Ig G 的分子量约为 143,000—149,000。在偏碱性的电泳场中，Ig G 的电泳速度是所有血清蛋白中最慢的

表 6-2 人类免疫球蛋白的性质

类 别	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
结构					
分子式	$(\gamma_2\kappa_2)$ 或 $(\gamma_2\lambda_2)$	血清型: $(\alpha_2\kappa_2)$ 或 $(\alpha_2\lambda_2)$ 分泌型** $(\alpha_2\kappa_2)$n-SC-J 或 $(\alpha_2\lambda_2)$n-SC-J 其中 n＝2 或 3	$(\mu_2\kappa_2)$5-J 或 $(\mu_2\lambda_2)$5-J	$(\delta_2\kappa_2)$ 或 $(\delta_2\lambda_2)$	$(\varepsilon_2\kappa_2)$ 或 $(\varepsilon_2\lambda_2)$
分子量($\times10^{-3}$)	143—149	158—162	800—950	175—180	185—190
沉降常数 S20,W	6.17S	6.18—11.4S	19.0S	6.6S	8.0S
重链类别	γ	α	μ	δ	ε
亚类	γ_1, γ_2, γ_3, γ_4	α_1, α_2			
轻链型号	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
同种异型专一性					
Gm	+	−	−		
Inv	+(κ 链)	+	+		
多糖含量(%)	2.5	5—10	5—10	10	12
生物学性质					
抗体活力	+	+	+		+
抗体价数	2	2	5—10		2
固定补体	+γ_1, γ_2, γ_3	0	+	0	0
穿过胎盘	+γ_1, γ_2, γ_3, γ_4		0		0
分泌	0	+α_1, α_2	0	0	
组织致敏:					
同种	0	0	0		+
异种	+γ_1, γ_2, γ_3	0	0	0	
结合类风湿性因子	+γ_1, γ_2, γ_3, γ_4				
正常人血清内含量(克/100毫升)	1.2	0.4	0.1	0.003	0.00004*
各类 Ig 相对含量(%)	70	23	6	0.17	
产量(克/天)	2.3	2.7	0.4		
生物学半衰期(天)	23	6	5	2.8	2—3

* 过敏性病人血清中含量增高。
** J 示 J 链,SC 示分泌片
(据 Cohn, 1971; Gally, 1973)。

(图 6-6)。分子由相同的两条重链(γ)和相同的两条轻链(κ 或 λ)构成。因此,分子式可用 $(\gamma_2\kappa_2)$ 或 $(\gamma_2\lambda_2)$ 表示。分子含糖量为 2.5%。

所有已经研究过的物种的 Ig G，按电泳速度又可区分为两部分：迁移较慢的 $\gamma2$ 和迁移较快的 $\gamma1$。$\gamma2$ 又可根据免疫电泳行为再分为二、三个亚部分：$\gamma2a$，$\gamma2b$，$\gamma2c$。人类 Ig G 按照电泳行为可区分为四个亚类：IgG_1，IgG_2，IgG_3，IgG_4。IgG_1 含量最高，占 Ig G 总量的～70%。其余 G_2，G_3，G_4 分别占18%，8%，3%。各亚类的抗原性不同，这是由于它们的重链的不变区的结构不同。

人类 Ig G 具有特殊的基因记号(同种异型专一性)——Gm 因子。IgG的生物学特性是能固定补体，穿过胎盘屏障，并具有使异种皮肤被动致敏以及和某些细胞(单核球，B

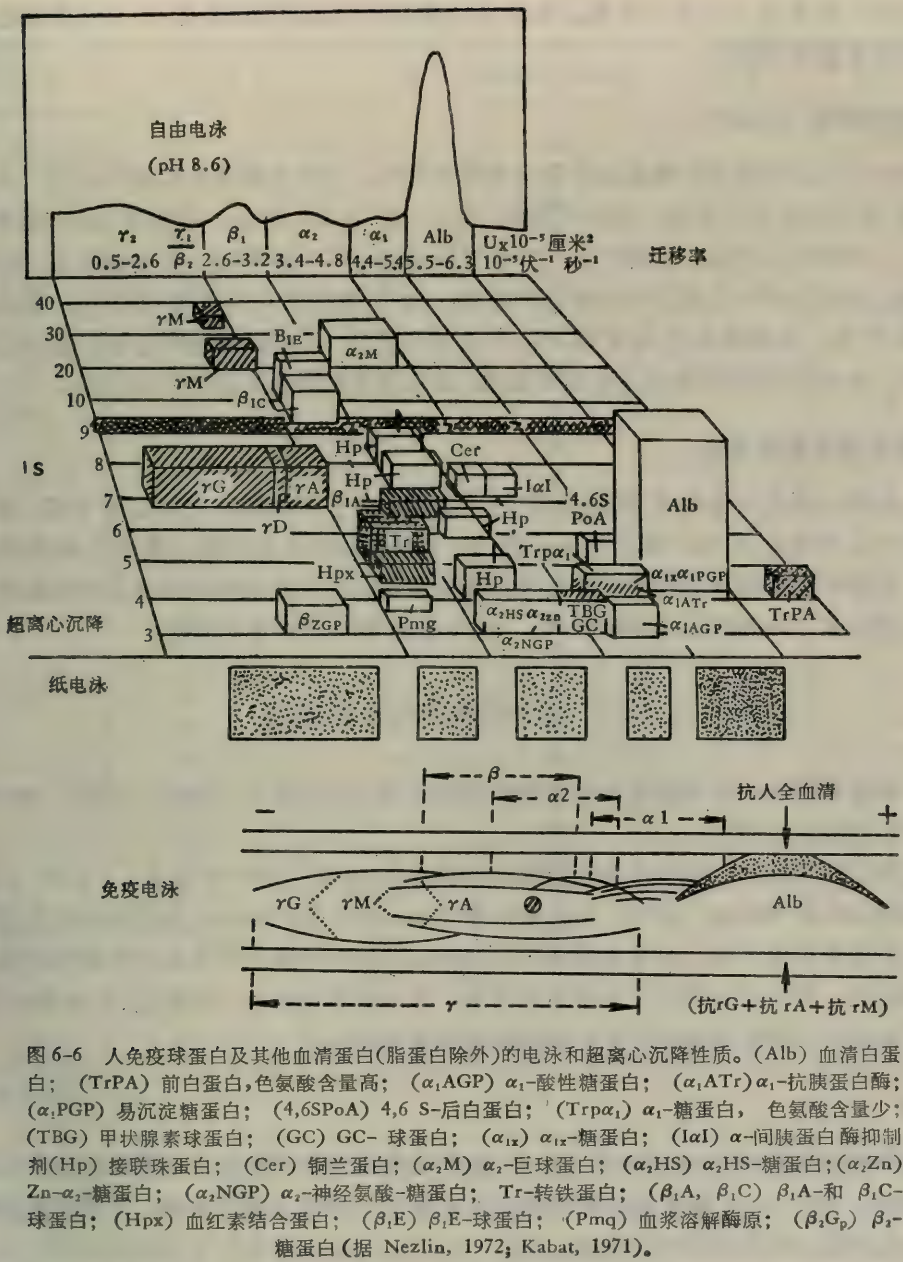


图 6-6 人免疫球蛋白及其他血清蛋白(脂蛋白除外)的电泳和超离心沉降性质。(Alb) 血清白蛋白; (TrPA) 前白蛋白,色氨酸含量高; (α_1AGP) α_1-酸性糖蛋白; (α_1ATr) α_1-抗胰蛋白酶; (α_1PGP) 易沉淀糖蛋白; (4,6SPoA) 4,6 S-后白蛋白; (Trpα_1) α_1-糖蛋白, 色氨酸含量少; (TBG) 甲状腺素球蛋白; (GC) GC- 球蛋白; (α_{1x}) α_{1x}-糖蛋白; (IαI) α-间胰蛋白酶抑制剂(Hp) 接联珠蛋白; (Cer) 铜兰蛋白; (α_2M) α_2-巨球蛋白; (α_2HS) α_2HS-糖蛋白; (α_2Zn) Zn-α_2-糖蛋白; (α_2NGP) α_2-神经氨酸-糖蛋白; Tr-转铁蛋白; (β_1A, β_1C) β_1A-和 β_1C-球蛋白; (Hpx) 血红素结合蛋白; (β_1E) β_1E-球蛋白; (Pmq) 血浆溶解酶原; (β_2G_p) β_2-糖蛋白 (据 Nezlin, 1972; Kabat, 1971)。

淋巴球等)亲合的能力。

2. 免疫球蛋白 M (Ig M)

Ig M 的特点是有很高的分子量 800,000—950,000。分子由五个亚基构成。每个亚基具有和 Ig G 类似的四条链构造,即两条相同的重链 (μ) 和两条相同的轻链 (κ 或 λ)。不久前还发现每个五聚体的 Ig M 分子还含有一条 J 链。因此,分子式可用 $(\mu_2\kappa_2)_5$-J 或 $(\mu_2\lambda_2)_5$-J 表示。Ig M 在电泳场中的迁移率相当于 β-球蛋白部分。根据抗原性和一级结

构的不同，Ig M 可分为两个亚类。Ig M 的生物学特性是能固定补体，并表现很强的溶血素和凝集素的抗体活性。

3. 免疫球蛋白 A(IgA)

这一类免疫球蛋白的特点是除在血清内存在外，还在各种外分泌液内存在。人类血清 Ig A 是以单体形式存在，分子式可用（$\alpha_2\kappa_2$）或（$\alpha_2\lambda_2$）表示。分泌型 Ig A 通常以多聚体（二聚体或三聚体）形式存在，并含有分泌片（SC）和 J 链；分子式可用（$\alpha_2\kappa_2$）$_n$-SC-J 或（$\alpha_2\lambda_2$）$_n$-SC-J 表示（其中 $n=2$ 或 3）。Ig A 单体的分子量比 Ig G 大，电泳迁移率比 Ig M 快，含糖量也比 Ig M 高。Ig A 有两个亚类，它们的重链和轻链的连结方式彼此不同。Ig A 的生物学功能是负责呼吸道、消化道等粘膜面的局部免疫防御。

4. 其他血清免疫球蛋白

人血清中还有小量 Ig E 和 Ig D 存在。它们的分子结构基本上和 Ig G 相似，可各用 $\varepsilon_2\kappa_2$ 或 $\varepsilon_2\lambda_2$ 和 $\delta_2\kappa_2$ 或 $\delta_2\lambda_2$ 表示其分子式。ε、δ 重链的分子量和糖含量都比 Ig G 的 γ 链要高。这两种免疫球蛋白都有抗体活性。Ig E 已证明是在异位性过敏反应中起重要作用的反应素抗体（Reaginic antibody）。Ig D 的生物学功能还不清楚。

（二）实验动物的免疫球蛋白

其他哺乳动物免疫球蛋白的类别和分子构造与人类的基本上相似。因此，也应尽可能采用相同的命名原则。

所有已研究过的实验室常用的哺乳动物都存在 Ig G、Ig M 和 Ig A。近来在豚鼠（Margniand 和 Hajos，1973）和大鼠血清（Isersky 等，1974）均证明有和人类 Ig E 相似的反应素抗体存在。Ig G 亚类的变化较大，在不同物种之间其理化性质和功能也有很大的差别，彼此之间的对应关系还不清楚，因此还不能有统一的命名（表 6-3）。除上述主要类别外，有的物种还可能存在独特的免疫球蛋白。

1. 家兔

同样存在和人类 Ig G、Ig M、Ig A、Ig E 在理化性质和功能上相似的四类免疫球蛋白（Mage，1971），以及相应的四类重链 γ、α、μ、ε。轻链主要为 κ 型，λ 型轻链含量<20%。大多数 γ 链均属于一个亚类。

家兔免疫球蛋白分子结构的研究开始最早（Porter，1959），主要是用正常的、不均一的 Ig G 抗体进行的。最近才开始采用某些单细胞株之均一抗体（Monoclonal antibody）进行研究。

2. 大鼠和小鼠

大鼠和小鼠的某些品系都能诱发分泌各类免疫球蛋白的浆细胞瘤，为研究各类免疫球蛋白的性质和结构提供了方便（参看 Potter，1972）。如 LOU/WSe 纯系大鼠的 184 种分泌型浆细胞瘤，经鉴定存在 7 类（或亚类）免疫球蛋白：IgM，IgA，IgE，Ig G_1，

表 6-3 各种哺乳动物 IgG 亚类

物　种	亚　类	γ　链	电泳相对迁移速度	固定补体	致敏皮肤
人	G_1	γ_1	慢	+	+
	G_2	γ_2	慢	+	−
	G_3	γ_3	慢	+	+
	G_4	γ_4	快	−	+
小鼠	G_1(F)	ϕ	快	−	
	G_{2a}(G)	γ	慢	+	+(对异种)
	G_{2b}(H)	η	慢	+	
	G_3		慢	−	−
豚鼠	G_1	γ_1	快		+
	G_2	γ_2	慢	+	−
牛	G_1	γ_1	快	+	+
	G_2	γ_2	慢		
马	G(T)	γ_1	快	−	
	G(a)	γ_{2a}	慢	+	
	G(b)	γ_2	慢	+	
	G(c)	γ_{2c}	慢	−	
大鼠	G_1	γ_1	快		
	G_{2a}	γ_{2a}	慢		+
	G_{2b}	γ_{2b}	慢		+
狗	G_1	γ_1	快		+
	G_{2a}	γ_{2a}	慢		+
	G_{2b}	γ_{2b}	慢		+
	G_{2c}	γ_{2c}	慢		
家兔	G_1	γ_1	快		
	G_2	γ_2	慢		+
田鼠	G_1	γ_1	快	−	−
	G_2	γ_2	慢	+	+

(据 Nezlin. 1972)。

Ig G_{2a}，IgG_{2b}，IgG_{2c}。Ig M，IgA，IgE 的理化性质、抗原性和生物学功能都和人类相对应的类别相似。IgG_1，IgG_{2a}，IgG_{2c} 的重链的抗原性彼此相似，和人类的 γ 链也有交叉反应，因此可能相当人类 Ig G 的几个亚类。IgG_{2b} 的性质特殊，很可能是大鼠特有的另一类别(或亚类)(Bazin 等，1974)。

正常小鼠(C_3H 和 BALB/C)也发现有五类(或亚类)免疫球蛋白存在，即 Ig A，IgM，IgG_1，IgG_{2a}，IgG_{2b}(Kalpaktsoglou 等，1973)。另一些作者报告，小鼠 Ig G 分为 4 亚类，彼此间的差异似乎比人类各亚类之间更大。

3. 豚鼠

豚鼠 Ig A(Vaerman 和 Heremans，1972)，Ig E(Margniand 和 Hajos，1973)的相继发现，证明同样也有和人类相似的几大类免疫球蛋白存在。Ig G 分为两个亚类，

即 Ig G_1 和 Ig G_2。Ig G_1 为同种细胞亲合抗体（Homocytotropic antibody），能传递 PCA 反应。但有耐热性，PCA 反应的潜伏期短（3 小时），因而可和 Ig E 区别开来（Margniand 和 Hajos，1973）。IgG_2 则不能传递 PCA 反应。最近有人用卵白蛋白免疫豚鼠时，还发现特殊的免疫球蛋白，称为 Ig S。具有耐热性，不参与 PCA 反应。其他抗原免疫时不能引起（Van Es 等，1973）。

4. 鸡

鸟类(鸡和鸭)也是免疫学上常用的实验动物。鸡正常血清中的免疫球蛋白主要分为两类：7.1 S 和 16.7 S。高分子量成分（16.7 S）相当于哺乳类的 Ig M；低分子量成分（7.1 S）和哺乳类 Ig G 有较大差异。其重链的分子量和糖含量都比 γ 链高，因此称为 Ig Y，以示区别（Leslie 和 Clem，1969）。不过也有人不加区别，仍称它为 Ig G。近来发现鸡肠道分泌物内存在类似哺乳类 Ig A 的成分，称为 Ig a（Lebacquerheyden 等，1972）或称为 Ig A（Bienenstock 等，1972）。

二、抗体的分离和纯化

抗体的纯化对于研究抗体的结构和功能、抗原抗体的相互作用、抗体的测定以及临床上的应用都是很需要的。

抗体分离、纯化的方法主要分两大类：1）非专一方法(化学方法)，提纯或浓聚某一类别的免疫球蛋白，供直接应用，或供进一步再用其他方法纯化之需。2）专一的方法，利用免疫吸附剂（主要是固相免疫吸附剂），可以得到在免疫学专一性上相当纯的抗体，包括抗半抗原抗体。后者在免疫学研究中有很广泛的用途。

（一）免疫球蛋白的分离

从血清中分离比较纯的免疫球蛋白有几种方法（Kabat 和 Mayer，1961；Chase 和 Williams，1968），其中最主要的方法是 Cohn 创立的冷酒精沉淀法（Cohn 等，1946）。至今在大量制备供医疗用途的 γ-球蛋白方面，仍被广泛采用。

1. 冷酒精沉淀法

全部分离过程如图 6-7 所示。血清加 3 倍体积的蒸溜水稀释，调节 pH 至 7.7（±0.1），冷却到 0°C。在激烈搅拌的条件下，加预冷的酒精（-20°C）到最后浓度为 20%，保持在 -5°C。产生的沉淀（A），含有大多数种类的免疫球蛋白。沉淀（A）悬浮于 25 倍体积的 0.015—0.02 *M* NaCl（冷）中，加 0.05 *M* 醋酸调节 pH 到 5.1，产生的沉淀(B)，包括大部分的 Ig A 和 Ig M，而 Ig G 留在上清液内。调节上清液的 pH到7.4，加冷酒精（-20 至 -30°C）到最后浓度为 25%，维持在 -5°C。所得到的沉淀含有 90—98% Ig G。不同动物，IgG 分离的条件和产量略有不同，列于表 6-4。从沉淀（B）可按下述方法进一步分离出 Ig A 和 Ig M 的混合物：将沉淀（B）悬浮在 0°C 水中，调节 pH 到 5.1，离心去除不溶的蛋白。调节离子强度到 0.01—0.0075，pH 5.5。然后加冷酒精

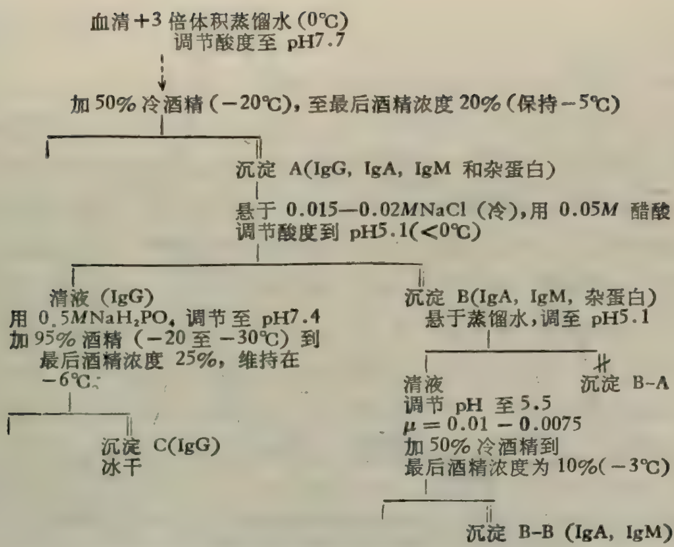


图 6-7 冷酒精沉淀法从血清分离免疫球蛋白(据 Chase 和 Williams, 1968)

表 6-4 从几种动物和人血清沉淀A分离 IgG 的条件

物 种	pH	沉 淀 条 件		IgG 产量
		酒精浓度(%)	离子强度	
人	5.1	15	0.01	65
山羊	5.2	0	0.01	65
家兔	5.2	10	0.01	70
大鼠	5.0	15	0.01	50
豚鼠	5.1	15	0.01	70
鸡	5.1	15	0.01	30
马	5.8	20	0.005	20

(据 Chase 和 Williams, 1968)。

到最后浓度为10%,保持在-2°C或-3°C低温,所得到的沉淀(B-B)主要含Ig A和Ig M。各中间步骤和最后产物所含蛋白成分可用自由电泳鉴定。由图6-8可见,沉淀C主要含Ig G,沉淀B-B主要含Ig A和Ig M(Chase 和 Williams, 1968)。

2. 中性盐分段沉淀法

通常采用更简便的硫酸铵或硫酸钠法沉淀免疫球蛋白。和酒精沉淀法比较,其优点是简便,蛋白质变性的危险较小,缺点是分离的纯度较差。血清在低温条件下,经50%饱和硫酸铵多次反复沉淀,脱盐后就可以得到Ig G的粗制品(Kendall, 1938)(图6-9)。按照 Kekwick (1940)提出的步骤,血清在室温连续用18%硫酸钠,12%硫酸钠和再一次12%硫酸钠沉淀,最后的沉淀主要含Ig G(图6-10)。

除此以外,用雷凡诺(Rivanol)沉淀也可以达到同样的目的。血清先和0.4%雷凡

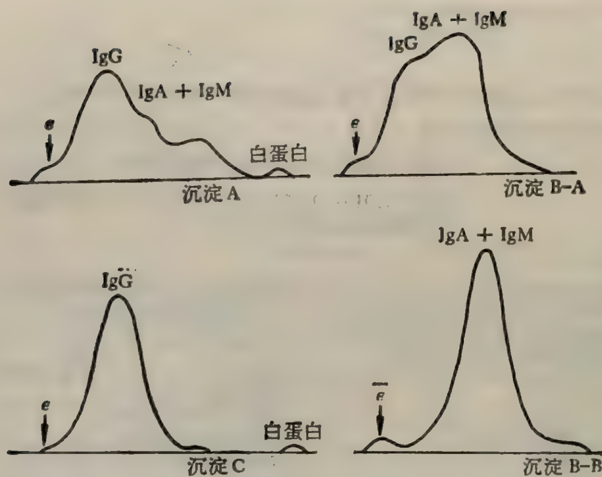


图 6-8　Cohn 氏冷酒精沉淀法各中间步骤及最后产物的蛋白成分的自由电泳鉴定(据 Chase 和 Williams,1968)。

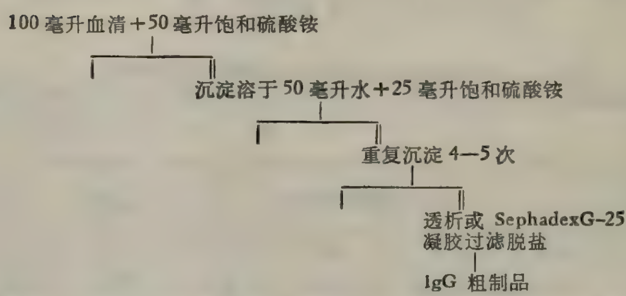


图 6-9　硫酸铵沉淀法制备 IgG 粗制品。整个过程在低温(<5℃)下进行(据 Kendall, 1938)。

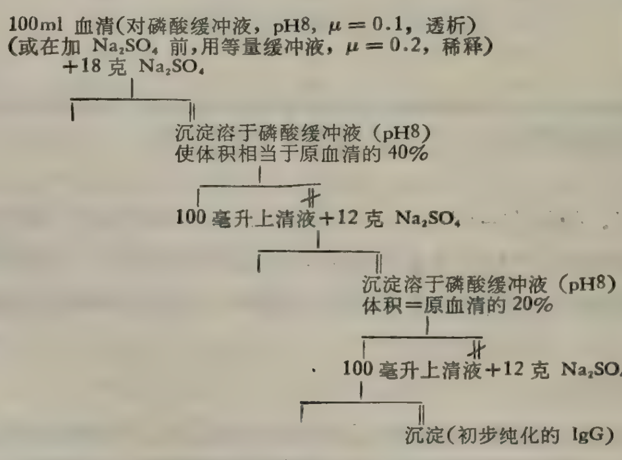


图 6-10　硫酸钠沉淀法初步纯化 IgG。全过程在室温下进行，加一滴甲苯防腐(据 Kekmick, 1940)。

诺混合，调节 pH 到 7.6—7.8。在这一条件下，除 Ig G 外的大部分蛋白质均沉淀。再加酒精或硫酸钠沉淀上清液中的 Ig G，沉淀中含 80—90% Ig G (Hořejši 和 Smetana, 1956)。用上述几种方法得到的免疫球蛋白的粗制品可以采用下述方法进一步纯化。

3. IgG 的分离和纯化

最常用于纯化 Ig G 的方法是 Deae-纤维素柱层析（Levy 和 Sober，1960）。血清或用上述方法得到的免疫球蛋白粗制品，先对磷酸缓冲液（pH 6.3，0.0175 *M*）透析，然后通过事先用此缓冲液平衡过的 Deae-纤维素柱，Ig G 不被阻留，便洗脱下来，所有其他血清蛋白均被阻留。这样就可以得到在免疫化学上纯的 Ig G。

用 Deae-Sephadex（氯式）可以简便、快速分离 Ig G。其步骤简述如下：Deae-Sephadex-A 50（粗颗粒）在水中溶涨后，再经 0.5*N* NaOH 和 0.5*N* 盐酸反复处理，然后和 0.01 *M* 磷酸缓冲液（pH 6.5）平衡。50 毫升人血清（无需透析）加 10 克处理过的 Deae-Sephadex。这一稠的混合物在冷处搅拌 1 小时，过滤。再用 25 毫升同一缓冲液分 4 次洗涤沉淀。合并滤液，再加 10 克新的处理过的 Deae-Sephadex，置冷处搅拌。过滤，Deae-Sephadex 沉淀再用 200 毫升缓冲液分多次（每次 15—20 毫升）洗涤。滤液几乎含有血清中的全部 Ig G，用 1 *M* K_2HPO_4 溶液迅速中和到 pH 7.5。纯 Ig G 产量为 160 毫克（97%）。用同一方法从 50 毫升家兔血清可得到 400 毫克纯的 Ig G。Deae-Sephadex 在 pH，离子强度改变时，凝胶颗粒的体积改变很大，因而不适宜在柱层析上反复使用。如改用 Qae-Sephadex 则可用于柱层析，在 pH 7.0，$\mu=0.1$ 的缓冲液条件下，分离免疫学纯 Ig G 可得到最好的结果（Joustra 和 Lundgren，1969）。为了便于保存，应将得到的 Ig G 溶液迅速浓缩到 3%，然后冰冻干燥。

在利用 Deae-纤维素分离 Ig G 时，应注意不超过离子交换柱的交换容量。当血清或浓缩的免疫球蛋白过量时，洗脱液中就可能混进杂蛋白（主要是转铁蛋白），影响分离的效果。为了避免这一缺点起见，应增加离子交换剂的量和柱长，或改用交换容量更大的离子交换剂。此外，还应注意，在通常采用的层析条件下，Deae-纤维素并不能分离 Ig G 的所有亚类。例如当用 Tris-缓冲液（0.01 *M*，pH 8.0）分离人 Ig G 时，柱上还残留着一个 Ig G 亚类（Ig G_4）（Škvaril 和 Morell，1970）。在低离子强度缓冲液条件下，电泳迁移率最低的成分（γ_2）能从柱上洗脱下来。由此在 0.005 *M*，pH 8.0 条件下，可分离出纯的大鼠 IgG_{2a}（Stchschulte 和 Austen，1970）。

4. IgM 的分离和纯化

根据分子的特性，Ig M 的分离通常采用几个步骤。人类 Ig M 髓细胞瘤蛋白已知是真球蛋白，因此分离最初步骤是先用低离子强度盐溶液沉淀。沉淀内还夹杂的 1—5% Ig G，可经过 Deae-纤维素柱层析去除。以后的纯化步骤可以采用凝胶制备电泳或凝胶过滤方法。凝胶过滤尤其适用，因为除 α_1-巨球蛋白外，Ig M 的分子量比所有其他血清蛋白的分子量大。α_1-巨球蛋白可以容易地在电泳上除去。凝胶过滤通常采用 Sephadex-G200 或 Bio-gel P-300，或琼脂糖珠均可。

近来还有人用聚乙二醇或真球蛋白沉淀，脱脂，琼脂凝胶电泳和免疫吸附等步骤从正常人血清的 Cohn III 部分，分离出免疫化学纯的 Ig M（Van der Hoven 等，1973）。

从正常兔血清可按下述方法分离 Ig M。先用 18% 硫酸铵沉淀免疫球蛋白。沉淀经透析后，再在 Deae-纤维素柱上分段洗脱，收集 pH 6.9 磷酸缓冲液（0.0175 *M*，加 0.15

M NaCl）洗脱的部分。再在同一离子交换剂上作第二次层析，并且收集 0.2 *M* Tris-缓冲液（pH 8.6）洗脱的部分。然后再在 Bio-gel P-200 上作凝胶过滤。最后得到免疫化学上纯的 Ig M，产量约为 0.025 毫克/1 毫升血清。

5. 其他种类免疫球蛋白的分离

从正常血清分离其他类别的免疫球蛋白，开初遇到很大的困难。因此，Ig A，IgE，Ig D 结构的研究，大多数是用相应的髓细胞瘤作材料。从正常血清分离 Ig A 的一种方法是先在 CM-纤维素上和 Ig G 分离。然后在 Teae-纤维素层析上和其他残留的杂蛋白（主要是 α-球蛋白和白蛋白）分离（Fahey 等，1966）。此方法的缺点是产量低，并可能有其他蛋白质混杂。

有人提出从正常人血浆分离相当大量纯 Ig A 的方法（Zschocke 等，1969）。先用 2 *M* 硫酸铵沉淀血浆蛋白，溶解沉淀并对 0.025 *M* 巴比吐缓冲液（pH 6.9）透析。弃去沉淀，用 Deae-Sephadex-A 50 处理上清液，逐步增加磷酸缓冲液的盐浓度洗脱吸附在交换剂上的蛋白质，并在瓷漏斗上将每次洗脱的溶液和沉淀分离。向第四次洗脱液（0.2 *M* 磷酸缓冲液，pH 7.5）加冷酒精至 25% 浓度（−5°C，pH 7.0，离子强度 0.03）沉淀蛋白。沉淀含有大部分 Ig A。再用硫酸铵沉淀一次。溶解沉淀，并在 Teae-纤维素上（pH 6.7）分段洗脱。收集 0.05 *M* 磷酸缓冲液洗脱的部分，含有 Ig A 和少量的 Ig G。夹杂的 Ig G 可用专一的免疫吸附剂（固定在纤维素上的抗-Ig G 抗体）去除。用此方法从 350 毫升血浆可以分离到 77 毫克的免疫电泳纯的 Ig A。后来，还有人用免疫吸附剂从正常人血清分离出 Ig A（Anderson 等，1970）。

同理可以利用抗-ε 重链抗体，借免疫吸附法从正常人血清分离 Ig E（Carrel 等，1971）。先用从髓细胞瘤提纯的 Ig E 免疫动物，得到抗-Ig E 抗体。将抗-Ig E 抗体加到聚合中的聚丙烯酰胺内，做成固相免疫吸附剂。用这种免疫吸附剂，从 40 毫升正常血清中可以分离出约 70 毫克蛋白质，主要为 Ig E，夹杂有 20% 的 Ig G。

（二）抗蛋白质和半抗原的抗体的分离

利用抗体和抗原（蛋白质或半抗原）的结合专一性，从抗血清中分离专一的抗体具有操作简便和专一性强的优点。这种方法包括几个主要的步骤：1）抗原抗体复合物的分离。将抗原加到对应的抗血清中形成抗原抗体复合物。洗涤去除非专一的血清蛋白后，分离出抗原抗体复合物；2）抗原抗体复合物的解离；3）将解离的抗原和抗体分开。当使用固相免疫吸附剂，即将抗原结合在纤维素、葡聚糖凝胶或琼脂糖颗粒的大分子载体上时，就可以把上述步骤简化为专一的吸附和洗脱两步。抗血清通过专一的固相免疫吸附柱时，同型抗体便被选择地结合在柱上；异型抗体和杂蛋白不结合而通过。再用低酸度的缓冲液或其他方法使结合的抗体从柱上解离洗脱下来，便可以得到对抗原或半抗原专一的抗体（Wofsy 和 Burr，1969）。

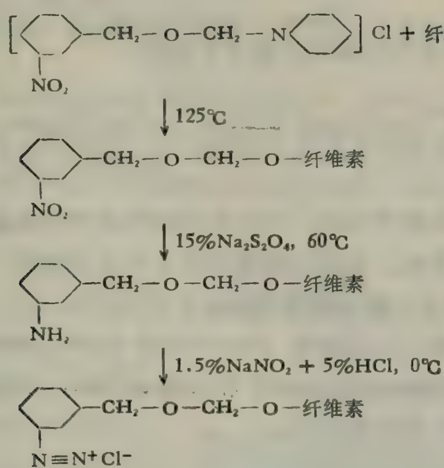
1. 利用免疫吸附剂分离抗蛋白质抗体

制备免疫吸附剂最常用的高聚物载体是纤维素，其优点是对蛋白质的非专一的吸附

量最小。各种葡聚糖凝胶珠和琼脂糖珠也是常用的载体。这些多糖载体需先活化，才能和蛋白质的一定基团共价结合。目前常用的活化方法主要有以下几类：

(1) 通过重氮键结合

Campbell 等 (1951) 最先使用这一类免疫吸附剂。先用 n-硝基氯苯处理纤维素，形成 n-硝基苯纤维素。再经过还原和重氮化，由此产生固定在纤维素上的能和蛋白质抗原反应的重氮活性基团。再加入蛋白质抗原溶液，短暂保温后，洗去未结合的多余抗原，便得到专一的免疫吸附剂。具有 $[R—O—CH_2—NR_3^+]$ Cl 构造的季胺盐，也很容易和纤维素结合。如 N-(m-硝基苯氧)-甲基吡啶氯盐，在 125°C 能和纤维素结合，再经过还原和重氮化，就可以得到能和蛋白质结合的纤维素重氮盐。其制备过程如下：



纤维素重氮盐和 2% 蛋白质抗原溶液在低温反应，就可以形成稳定的结合物。抗原的结合量决定于纤维素上的重氮基团数目。1 克粉末纤维素免疫吸附剂可固定 10—50 毫克以上的蛋白质。这种限制可能不是由于重氮基团数目不够，而是由于纤维素颗粒表面积的限制。颗粒愈细，表面积增加，结合容量也增加。

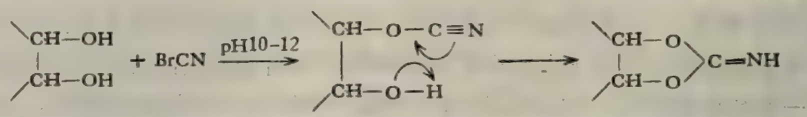
为了固定多糖抗原，可先用过碘酸处理使出现活泼的醛基。后者能和 NH_2-基反应 (Sanderson 和 Wilson, 1971)。

(2) 溴乙酰纤维素

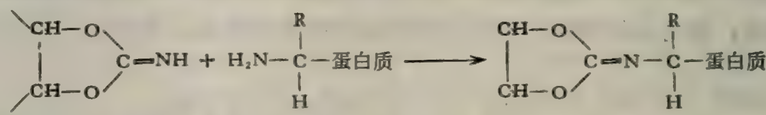
溴乙酰纤维素也常用于免疫吸附剂的制备 (Robbins 等, 1967; Gill 和 Bernard, 1969)。制备的方法如下：溶于 30 毫升二氧杂环已烷的 100 克溴乙酸加 10 克纤维素粉，室温搅拌 20 小时。然后再加 75 毫升溴乙酰溴。搅拌 10—12 小时后，再倒入 7 升水中。洗涤纤维素沉淀，在湿的状态下低温保存。和抗原蛋白质的结合是在 pH 8.9 碳酸氢钠缓冲液内进行的。洗去多余蛋白质，将吸附剂浸于 0.05 *M* 2-氨基乙醇溶液 (pH 8.9) 内抑制未反应的溴。悬浮 24 小时后，洗去未起反应的蛋白质。然后再悬浮在 8 *M* 尿素内 24 小时，去除和纤维素非共价结合的蛋白质。

(3) 用溴化氰将多肽结合到多糖载体

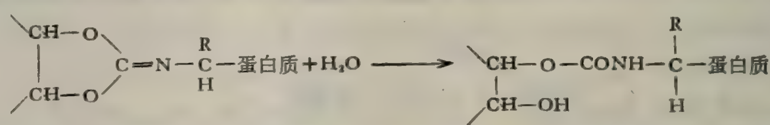
用 CNBr 在碱性溶液中处理纤维素、葡聚糖凝胶珠，琼脂糖珠等多糖载体时，就可以使这些多糖载体活化（Porath，1967）。这种活性产物可能是亚氨基碳酸酯和氰酸。反应过程如下：



在中性或弱碱性溶液内，活化的多糖载体可以和蛋白质抗原的氨基反应：



然后再通过缓慢的水解过程，转化为稳定的氨基甲酸酯：



连接蛋白质和多糖载体的键在强酸、中性或弱碱溶液内都是稳定的，并且用 CNBr 处理葡聚糖凝胶珠或琼脂糖珠时，是在比较温和的条件下进行的，不致破坏凝胶颗粒。因此，对纤维素、葡聚糖凝胶珠和琼脂糖珠都可以广泛应用。

此外，还可以用戊二醛使蛋白质凝集（Arrameas 和 Guilbert，1971）或将蛋白质混合在正在聚合中的聚丙烯酰胺中（Carrel 和 Barandun，1971），均可以用作固相免疫吸附剂，但没有前述的几种那样有效。

(4) 结合抗体的洗脱

抗体溶液通过专一的免疫吸附柱时，便和固定在大分子载体上的抗原结合，形成抗原抗体复合物而被吸附在柱上。已和固相抗原结合的抗体，通常可用低酸度缓冲液，如 pH 2.2 甘氨酸缓冲液洗脱。然后迅速加浓的中性缓冲液或固体的碳酸氢钠中和。也有人尝试在接近中性条件下洗脱，如加浓的硫氰酸盐溶液（pH 6.0—6.8）可分离出 1/2—3/4 抗体（Dandliker 和 Saussure，1968；Carrel 和 Barandun，1971）。加浓氯化镁、碘化钠或碘化钾溶液也有效。在 pH 7.5，这些试剂可解离出和低酸度缓冲液解离的等量的抗体。为了减少非专一的吸附，在抗体洗脱以前，还可以先用 3 *M* 尿素溶液（pH 8）处理免疫吸附剂，洗去非专一吸附的蛋白质。在上述条件下，免疫吸附剂和抗体的复合物不致解离。

2. 抗半抗原抗体的分离

近年来多用与固相载体结合的半抗原作为免疫吸附剂来分离抗半抗原抗体。制备免疫吸附剂常用的载体仍可用纤维素（Borek 和 Fabian，1970；Vannier 等，1965），琼脂糖珠（Wufsy 和 Burr，1969），变性蛋白亦有采用（Szafran 等，1969）。例如，常用的 DNP-，Dansyl-半抗原基团都易于和氨基纤维素结合。

吸附在免疫吸附剂上的抗半抗原抗体的洗脱方法的选择，应根据半抗原的化学性质来决定（Hoyer 等，1968）。带负电荷的半抗原，如苯甲酸或苯砷酸等，其抗体和半抗原纤维素的复合物在 pH 5—7，或 pH 1—3，能很好地解离。用 pH 5—7 的磷酸缓冲液洗脱时，若加 1 *M*NaCl，抗苯甲酸抗体的洗脱产量可增多。对于正电荷半抗原，如苯基三甲基铵以及中性的亲水性半抗原，如苯基-β-吡喃苷，其抗体和专一免疫吸附剂的复合物在低于 pH 4 的酸性溶液中解离。对于中性疏水性半抗原，如 DNP，其抗体一般在低酸度条件下不能洗脱。因此，只好用相应的半抗原来竞争取代。

用同一半抗原载体结合物免疫动物时，随免疫时间不同，产生的抗半原抗体的亲合力也不同。因而从专一的免疫吸附柱上洗脱的行为也不同（参看第十一章，308页）。这说明抗体的高度不均一性。

三、抗体的不均一性和匀一的抗体

如上所述，用一个纯化的抗原来免疫动物，产生的抗血清与同一抗原专一地结合，再使这样的抗原抗体复合物解离，可得到纯化的抗体。可是，经过这样复杂手续提纯的抗体仍旧是一群多种多样的免疫球蛋白分子的混合物。抗体的这种不均一性主要是由于以下两方面的原因造成的。

（一）外源不均一性

抗原大分子具有许多抗原决定簇，每一个决定簇可能引起一种抗体。因此，一个蛋白质的抗血清不含有与整个分子的全部决定簇起反应的单一的抗体，而是包含着针对个别抗原决定簇的许多不同的抗体的混合物。一些动物可能产生对某些决定簇的抗体，另一些个体可能产生对另一些决定簇的抗体。现已经可以用免疫吸附剂制备半抗原专一的抗体。例如，注射一种偶氮蛋白质后产生的抗血清，可先通过一个和偶氮半抗原结合的纤维素柱，然后再通过一个和载体蛋白质结合的纤维素柱，分别选择地吸附，用这样的方法就可以把半抗原专一的抗体和载体蛋白质专一的抗体分离开来。同理，两个不同的半抗原专一的抗体也可以彼此分离开来。然而，甚至经过这样纯化的半抗原专一的抗体仍然是不均一的，因为同一半抗原决簇在不同蛋白质载体分子上所处的空间关系可能不同。这种不均一性又称为地位不均一性（图 6-11）。

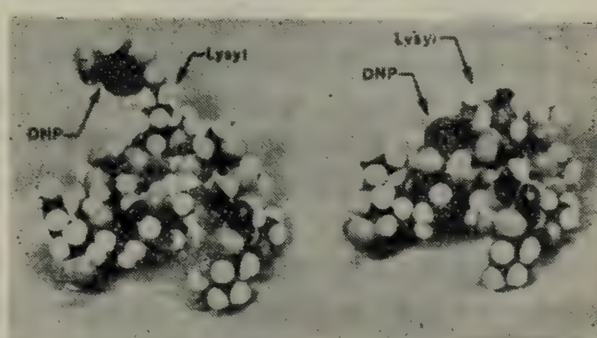


图 6-11　DNP 半抗原在载体蛋白质分子上所处的空间关系不同，而产生地位不均一性。（左）DNP-赖氨酰构造，从分子表面突出。（右）DNP-赖氨酰基团平铺在蛋白质分子表面，和邻近氨基酸残基共同组成一个决定簇（据 Brenneman 和 Singer，1970）。

外源不均一性在评定抗血清的效用时有重要的实际意义。例如，注射白喉类毒素可能产生抗片段 B（细胞专一性基团）的抗体和抗片段 A（毒性基团）的抗体，而只有前者对

机体有保护作用(参看第一章，52 页)。

(二) 内源不均一性和抗体的血清学专一性

内源不均一性是指免疫球蛋白分子的化学结构上的差异和多样性。这种结构上的差异通常可以用血清学方法检验出来，据此可将免疫球蛋白及其肽链(重链和轻链)分为不同的血清学类型。抗体的血清学类型的差别反映了抗体形成细胞的遗传性差异，因此可以作为抗体分子的遗传标记。免疫球蛋白的这些血清学专一性可分为三类，反映了抗体分子结构在不同水平的变化：

1) 同族专一性 (Isotypic specificities) 同一物种所有个体共同具有的抗原专一性。据此可将免疫球蛋白区分为类 (Class) 和型 (Type)，以及亚类 (Subclass)；

2) 同种异型专一性 (Allotypic specificities) 同一物种的不同个体间存在几种形式的抗原专一性，即多型现象 (Polymorphism)；

3) 个体型专一性 (Idiotypic specificities) 每一个体的个别抗体(或髓细胞瘤蛋白质)具有的独特的抗原专一性。根据上述血清学专一性,免疫球蛋白又可作如下区分：

1. 类别 (Classes)

根据重链的血清学类型，分子量大小(亚基数目)，糖含量等方面的不同，同一物种的抗体可分为几类 (Class)。 各类抗体的轻链的血清学类型是相同的 (κ 或 λ 型)，而重链则各不相同。人类的抗体已知有五类：Ig G，Ig M，Ig A，Ig D 或 Ig E。它们所含的重链(按血清学类型的区别)分别为 γ，μ，α，δ，ε 链。各类抗体所含的轻链的血清学类型是相同的，或者为 κ 链，或者为 λ 链。

每一类抗体中，按其重链构造的变异又可分成几个亚类 (Subclass)。如人类 Ig G 可分为四个亚类：Ig G_1，Ig G_2，Ig G_3，Ig G_4 (或称 γ_1，γ_2，γ_3，γ_4)。它们除了重链的抗原性有差别外，链间二硫键的数目和位置也有不同(参看第七章，图 7-6)。Ig A 和 Ig M 的重链也至少存在两个亚类。 决定亚类血清学专一性的抗原决定簇都位于抗体的 Fc 片段,即重链的不变区上。

抗体的抗原结合专一性和类别之间没有关系。任何一类的抗体都可能产生任何一种结合专一性的抗体。换句话说,对同一抗原，体内可能形成几类 (Ig G、Ig M 等)具有相同的结合专一性的抗体。萤光标记抗体法显示，各类抗体是由不同的浆细胞产生的。一般认为，一个细胞只能产生一类抗体，不能同时产生两类抗体。抗体的类别是由几个不同的基因控制的。

2. 型别 (Type)

各类抗体的轻链是相同的，或者为 κ 链,或者为 λ 链。因此,同一物种的各类抗体又各自可因其所含轻链的型别分为两型。人类 Ig G 的轻链平均约 70% 为 κ 型，30% 为 λ 型。然而，同一物种的个别抗体的轻链型别的相对量可能和平均值有很大差别。例如，人冷性凝集素的轻链只有 κ 型，豚鼠抗 DNP 抗体也只有这一型的轻链。轻链近 N 端半段的氨基酸排列顺序存在差异，据此又可分为亚型 (Subtype)。 人类 κ 链可分为三个

亚型，λ 链可分为五个亚型（Hood 和 Talmage，1970）。型和亚型各自都是由不同的非等位基因控制的。各亚型的区别，由于其氨基酸排列顺序还不清楚，暂时用专一的抗原记号表示，如人类 λ 链的 $Kern^{+}$，$Kern^{-}$；Oz^{+}，Oz^{-}。

3. 同种异型（Allotypes）

重链的每一亚类和轻链的每一亚型，又可根据存在这一个或另一个等位基因，而发生结构(抗原性)的改变，称为同种异型。同种异型是由同一个基因座的几个等位基因控制的，通常包括肽链上一定位置的一个氨基酸的置换。例如，人类 κ 链的 191 位置在 Inv (a+)，现名 Inv (1+)，为 Leu；Inv (b+)，现名 Inv (3+)，则为 Val (图 7-3)。抗体的同种异型专一性是和抗体的类别和型别专一性互不相关的。纯系动物只产生一种同种异型的抗体，照旧产生各种类别和型别的抗体。

人类控制同种异型专一性的基因在染色体上的位置还没有确定，暂时按照控制重链和轻链的抗原结构的因子分为两个系统：控制重链的称为 Gm，控制轻链的称为 Inv. Gm. 和 Inv. 系统是由一些独立的基因座控制的，它们各自又包括一系列的等位基因（表 6-5；表 6-6）。每一个体按表型(肽链的抗原性类型)可记录如：Gm (1，-2，3，4，-5)，Inv (1，-2，3)；或只记正结果：Gm (1,3,4)，Inv (1,3)。或者按遗传学基因型的记法可写为：Gm^{1}，Gm^{4}……等（Bull. W. H. O. 33，721，1965；Grubb，1970)。

表 6-5　人重链 Gm 因子的名称

原用名称	现用名称*
a	1
X	2
$b^{W}=b^{2}$	3
f	4
$b=b'$	5
c	6
r	7
e	8
p	9
b^{α}	10
b^{β}	11
b^{γ}	12
b^{3}	13
b^{4}	14
s	15
t	16
z	17
g	21
y	22
n	24

* (Bull. W. H. O. 33. 721, 1965)
(Adv. in immunology 7:18)

表 6-6　人类轻链 Inv 因子的名称

原用名称	现用名称*
1	1
a	2
b	3

* (Bull. W. H. O. 33, 721, 1965)

表 6-7　家兔 Aa, Ab 因子的名称

正式名称	肽　链
Aa1, Aa2, Aa3	重链 (Fd 片段)
Ab4, Ab5, Ab6	轻链
Ab7, Ab8	重链 (Fc 片段)

其他物种，如家兔，有两个基因座 Aa，Ab，分别控制重链和轻链的同种异型特性。每一基因座又至少包含三个以上的等位基因(表 6-7)。

Gm系统只在 Ig G 分子出现，而 Inv 系统在 Ig G，Ig A 和 Ig M，以及某些 Benee Jones 蛋白质均可出现。

4. 个体型（Idiotype）

一种动物某一个体产生自己特有的抗体分子，不但和同种动物其他个体的同一抗原结合专一性的抗体不同，而且和自身的具有其他抗原结合专一性的抗体也不同，这种抗体称为个体型抗体（Idiotypie antibody）。例如，用某甲的专一抗体（抗 A 血型物质）免疫家兔，得到的抗血清经过正常人γ-球蛋白吸附后，所剩余的抗体只能和某甲的抗 A 起反应，而不能和其他人的抗体起反应，也不能和某甲自己的其他专一的抗体（如抗右旋糖的抗体）起反应（Kunkel 等，1963；1966）。家兔也存在同样的现象。此外，这类抗体还可能是由同一个体之不同的抗体形成细胞，针对同一抗原决定簇产生的，它们的差别反映这些细胞内在的遗传性的差别（Slater 等，1955；Oudin，1966）。

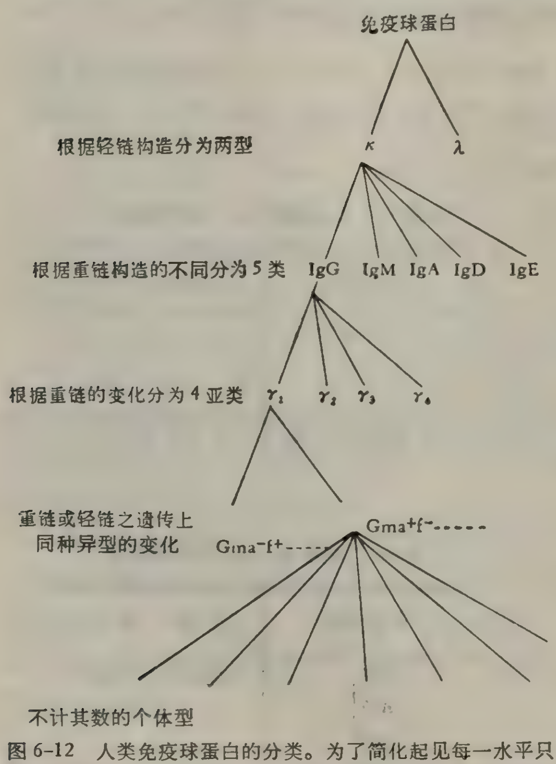


图 6-12 人类免疫球蛋白的分类。为了简化起见每一水平只举一个分枝为例。个体型为每一个体所特有，可同时包括重链和轻链的变化(据 Porter, 1967)。

有证据表明个体型抗体的抗原专一性位于该抗体分子的 Fab 片段上，而不是位于Fc 片段上（Oudin 和 Michel，1969）。抗个体型抗体的抗血清能抑制半抗原（如 P-硝基苯甲酸）和相应的个体型抗体结合（Brient 和 Nisonoff，1970）。反之，半抗原的存在也能抑制抗个体型抗体的抗血清和该个体型抗体的反应（Brient 等，1971）。每一只家兔对一定抗原可形成几种个体型专一性不同的抗体，并且在动物免疫过程中，它们出现、持续和消失的时间也各不相同（McDonald 和 Nisonoff，1970）。以上这些事实提示个体型抗体的抗原专一性是和该抗体的易变区结构相关连的。个体型专一性决定簇可能包括或紧靠近该抗体的结合位点，并受到结合位点的影响。然而，它们表现出的多样性，超过结合位点本身的专一性的多样性。

各类免疫球蛋白的抗原结构是十分复杂的。除去上述几种抗原决定簇外，还存在肽链或亚基重组合时共同形成的决定簇。例如，人类 κ 轻链的某些决定簇只有在和 μ 重链重组合出才能表现出来。Ig G 髓细胞瘤蛋白质 Fab 片段的某些抗原决定簇也是这样。多聚体免疫球蛋白，如分泌型 Ig A，亚基聚合时出现单体原来没有的抗原决定簇。和其他球蛋白抗原一样，有些原来位于抗体分子内部的决定簇，如多聚体 Ig A 的

分泌片，只有经过酶解后，原来被掩盖的抗原决定簇才能表现出来。

总之，由上述可见，正常人和动物的抗体是具有各种抗原专一性的免疫球蛋白分子之高度复杂的混合物。两种型的轻链（κ 或 λ）可以和各类、亚类的重链配合，而重链、轻链本身又可能有各种同种异型，专一性不同的抗体分子又可以有各种的个体型。由于上述几重的差异，任何个体的血清都是极其多种多样的免疫球蛋白分子的混合物（图6-12）。然而，抗体种类的这种多样性和抗体的结合位点的抗原结合专一性没有直接的关系。就目前所知的，各种各类的免疫球蛋白分子都可能具有任何一种抗原结合专一性。因此，抗体一般结构的多样性和抗体结合位点的多样性（能和多种多样的抗原结合）是两回事，它们的遗传控制也应当是两回事。

抗体的高度不均一性给抗体细微结构（氨基酸排列顺序）的测定造成了似乎难于克服的困难。然而，幸好天然存在某些抗体形成细胞的肿瘤，能产生各种类型的，均一的免疫球蛋白，为一级结构测定提供了好材料。

（三）髓细胞瘤蛋白质的均一性

人类和小鼠多发性骨髓瘤的浆细胞合成的髓细胞瘤蛋白质是化学结构上均一的免疫球蛋白。每一种髓细胞瘤蛋白质相当于一定类型的免疫球蛋白，只具有一型的轻链，一个亚类的重链，它们只属于一定的同种异型，并且每条链只具有一种特异的氨基酸排列顺序。因此，只属于一种特异的个体型。在聚丙烯酰胺圆盘电泳或淀粉凝胶电泳上，髓细胞瘤蛋白质的轻链和重链，各呈现一条或少数几条清楚的带，这和正常 Ig G的轻链呈现为一条弥散的区域（不均一混合物）形成明显的对比（图6-13）。从 Burnet 的无性繁殖细胞系选择学说看来，每一种髓细胞瘤蛋白质可看作是发源于一个突变细胞的，浆细胞的无性繁殖系（Clone）的产物，或者简称为单细胞株蛋白质（Monoclonal protein）[1]。照此类推，正常血清中种类繁多的抗体群可认为是多种多样的单株蛋白质的混合物。

多发性骨髓瘤病人血清中，髓细胞瘤蛋白质的含量相当高，其浓度比其他的免疫球蛋白高几倍，易于分离和提纯。此外，约有半数的病人尿内排泄大量的异常的蛋白质。这种蛋白质是 Bence Jones 在1847年发现的，故称为 Bence-Jones 蛋白质。后来，G. Edelman 和 Galley（1962）证明 Bence-Jones 蛋白质相当于同一病人血清中的髓细胞瘤蛋白质的轻链，并且化学结构是均一的（图6-14）。

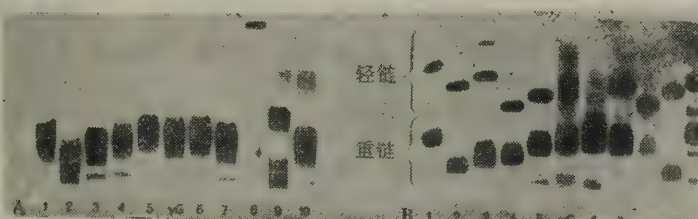
(A)  (B)

图6-13 几个病人髓细胞瘤蛋白质和正常人免疫球蛋白的淀粉凝胶电泳的比较。
（A）完整的免疫球蛋白电泳行为近似。（B）解离成重链和轻链后，髓细胞瘤蛋白质在轻链位置表现为清楚的带，而正常蛋白质表现为一条弥散区域（不均一的混合物）。No. 8 为 Bence Jones蛋白质，因此没有重链（据 (Edelman, 1970)

1）无性繁殖系（clone），亦译作"克隆"，是指发源于单个细胞的、具有相同遗传性的细胞群，所产生的抗体称为单株抗体（或单克隆抗体）（monoclonal antibody），具有均一的抗原结合专一性。

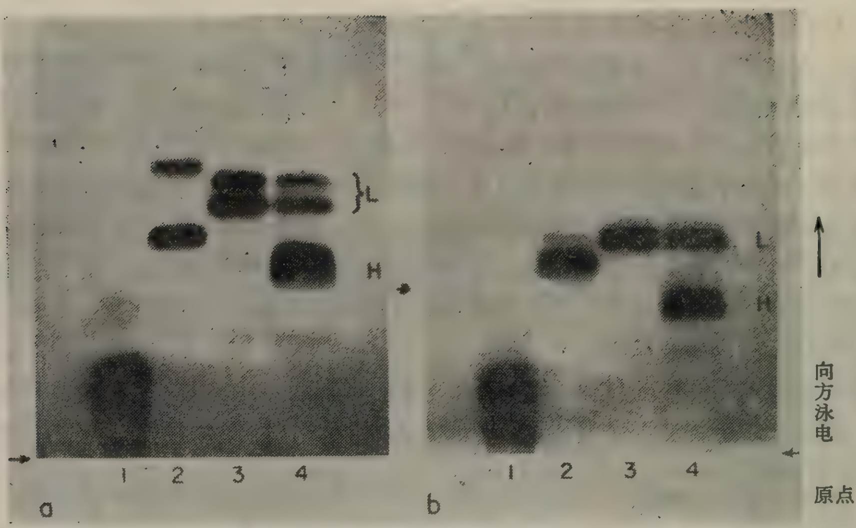


图 6-14 Bence Jones 蛋白质和髓细胞瘤蛋白质还原烷化前后在 8*M* 尿素内之淀粉凝胶电泳图的比较 a. 病人 Haw。 b. 病人 S。(1) 髓细胞瘤蛋白质。 (2) Bence-Jiones. 蛋白质。(3) Bence-Jones 蛋白质经还原和烷化。 (4) 髓细胞瘤蛋白质经还原和烷化。
(据 Edelman 和 Gally, 1962)。

BALB/C 小鼠或 BALB/C 杂种小鼠，注射石蜡油后，也能产生髓细胞瘤蛋白质和 Waldenström 巨球蛋白(相当于 Ig M) (Potter, 1972; Cohn, 1967)。

迄今已研究过的髓细胞瘤蛋白质(包括小鼠浆细胞瘤蛋白质)有几百种，它们分别属于 Ig G, Ig M, Ig A, Ig E, Ig D。这些蛋白质的发现为免疫球蛋白一级结构的测定提供了方便的材料。截至 1971 年，已经测定过一级结构的 Bence-Jones 蛋白质，κ 链有 50 种，λ 链也有 50 种，没有发现其中任何两种的氨基酸排列顺序是完全相同的。

(四) 均一的抗体

虽然髓细胞瘤蛋白质提供了研究各类免疫球蛋白一级结构的好材料，抗体结合位点结构的研究还需要得到对已知抗原或半抗原有专一结合能力的均一抗体。鉴别均一抗体的标准，除要求免疫球蛋白属于同一类和亚类，基因记号相同，轻链属于同一型或亚型，电泳行为均一外，还要求个体型专一性和结合位点也是均一的。这就是说要求得到全部化学结构相同的单株抗体。目前寻找均一抗体的途径有两方面：

1. 有抗体活力的髓细胞瘤蛋白质

近来陆续发现许多种小鼠髓细胞瘤蛋白质对已知的抗原或半抗原有专一的抗体活力，如对 DNP-，TNP-基团、葡聚糖、肺炎球菌 C 多糖、β-N-乙酰氨基葡萄糖等抗原和半抗原的专一结合能力 (Potter, 1970; Eisen 等, 1970; Vicari 等, 1970)。具有 DNP 专一结合能力的髓细胞瘤蛋白质用免疫平衡透析法测定时，表现出对半抗原的均一的结合能力，因而认为其抗原结合位点是均一的。人类也发现有类似抗体活力的髓细胞瘤蛋白质，如与肝素、心脏类脂、细菌抗原(肺炎球菌 SI, III, VIII, X) 起专一反应的 Ig G 和 Ig M 单株蛋白质 (Freedman 等, 1976)。

2. 均一抗原诱导的抗体

有人利用化学构造简单的决定簇，尤其是多糖，如葡聚糖、果聚糖、肺炎球菌荚膜多糖等，在特定的免疫条件下能在人和动物上得到均一性近似髓细胞瘤蛋白质的抗体。例如，从一个人得到的果聚糖抗体，100% 属于 IgG_1，100% 为 κ 链，85% 为 Gm(－)(虽然此人的遗传型为杂合子)，不过不清楚结合位点是否是均一的（Yount 等，1968）。同样地，一部家兔对链球菌的 C 多糖（Krause，1970），或 III 和 VIII 型肺炎球菌荚膜多糖（Haber，1970）产生的抗体，在电泳行为，重链和轻链的性质，个体型专一性等方面都是均一的。免疫平衡透析实验表明抗原结合位点也是均一的。因此，也许同样可以看作是单株抗体。对家兔抗链球菌多糖的均一抗体(同种异型 a2) 的重链的氨基酸排列顺序分析结果发现其 N 端 70 氨基酸残基和 C_H 区 127—179 残基存在单一的排列顺序(Fleishman，1971，1973)。 从 6 只部分纯系家兔得到的抗链球菌 A 抗原（鼠李糖均聚物)的均一抗体（b4K）的轻链之 N 端 42 残基也有基本上相同的排列顺序(Braun等，1975)。这些事实均证实了上述看法。

蛋白质抗原有许多不同的抗原决定簇，引起的抗体是非常不均一的。但是，从天然蛋白质分子分离出来的一定决定簇(如溶菌酶的“环肽”)，则可能产生比较均一的抗体。例如，溶菌酶的抗体用等电点聚焦法可区分出 24 条以上的带，而“环肽”的抗体只有 9 条带，其中 2 条特别显著。 抗天然溶菌酶抗体的轻链在聚丙烯酰胺凝胶电泳上分出 6 条带，而抗“环肽”抗体的轻链只有 2 条带（Maron 等，1971）。这一实验虽然还是初步的，但指出了将来用实验方法得到天然蛋白质抗原一定决定簇的均一抗体的可能性。

总之，用类似上述方法得到均一抗体是有成功希望的[1]。将来对这些有一定结合专一性的均一抗体的化学结构，以及抗原结合位点结构的测定，可望对抗体的结构提供更直接的结果。

参　考　资　料

一般参考书和综述

Cohn. S. (1971), Structural and function of immunoglobulin. In: ''New concepts in allergy and clinical immunology''.

Cohn, S. and Milstein. C. (1967). Structure and properties of immunoglobulins. Advan. immunol. 7. 1.

Day, E. D. (1972). Advanced Immunochemistry. The Williams & Wilkins Company/Baltimore.

Edelman, G. M. and Gall, W. E. (1969). The antibody problem. Ann. Rev. Biochem. 38. 415.

Edelman, G. M. (1970). The structure and function of antibodies. *Sci. Amer*. 223.

Edelman, G. M. (1971). Antibody structure and molecular immunology. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 190: 5.

Gally, J. A. (1973). Structure of immunoglobulins. In: ''The Antigens'' ed. by M. Sela, Acad. Press.

Merler, E. (1970). Immunoglobulins. Biological aspects and clincal uses. Nat. Acad. Sci. Washington, D. C.

Kabat, E. A. (1968). Structural concepts in Immunology and Immunochemistry. Holt, Rinehart and Winston, Inc., N. Y.

Kabat, E. A. (1972). General features of antibody molecules. In: ''Specific receptors of antibodies. antigens, and cells''. 3rd Int. Convocation of Immunol., Karger, Basel. p. 1.

Porter, R. R. (1967). The structure of antibodies. *Sci. Amer*. 217, 81.

Незлин, Р. С. (1972). Строение и Биосинтез Антител, изд. «Наука», Москва.,

1) 自从 Köhler 和 milstein 在1975年首先用杂交细胞瘤技术（Hybridoma technicque）产生均一的单株抗体获得成功以来，这一方法已在各方面得到广泛的应用(参看十四章 460 页)。

抗体的一般性质和命名

Bazin, H. Beckers, A. and Querinjean, P. (1974). Three classes and four (sub) classes of rat immunoglobulins: IgM. IgA, IgE and IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}. *Europ. J. Imm.* **4**, 44.

Isersky, C., Kulczycki, A. and Metzger, H. (1974). Isolation of IgE from reaginic rat serum. *J. Immunol.* **112**, 1909.

Kalpaktsoglou, P. K., Hong, R. and Good, R. A. (1973). The five classes of Igs in normal C_3H and BALB/C mice. *Immunol.* **24**. 303.

Margniand, R. A. and Hajos, S. E. (1973). Guinea-pig reaginic antibody. I. Isolation and purification of an antibody protein with characteristics of IgE. *Immunol.* **25**. 323.

II. Physicochemical and biological properties. *Immunol.* **25**, 333.

Potter, M. (1972). Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. Physiol. Rev. 52, 631.

Mage. R. J. (1971). Structural localization. allelic exclusion and linkage relationships of rabbit allotypes. Progress in Immunology I, p. 47. ed. by B. Amos, Acad. Press.

Vaerman, J. P. and Hermans, J. F. (1972). The IgA system of the guinea-pig. *J. Immunol.* **108** 637.

Van Es, L. Harink, H. K. and Pondman, K. W. (1970). The specificity of skin-sensitizing antibodies in the guinea-pig. *Clin. exp. Immunol.* **6**, 741.

———— (1973). An unknown guinea-pig Ig with strong antibody activity to egg albumin. *Immunol.* **24**. 1087.

WHO, (1964).World Health Organization: Nomenclature for human immunoglobulin. *Bull. W. H. O.* **30**. 447.

WHO. (1969). An extension of the nomenclature for immunoglobulins. *W. H O.* **41**, 975.

抗体的分离和纯化

Aalberse, R. C., et al. (1973). The purification of human polyclonal IgE by immunosorption. *Immunochemistry* **10**, 295.

Anderson, T. O., Zechocke, R. H. and Bach, G. L. (1970). Studies on IgA. II. Isolation of IgA from small volumes of human serum by immunoadsorption. *J. Immunol.* **105**, 146.

Avrameas, S. and Guilbert, B. (1971). Biologically active water-insoluble protein polymers. Their use for the isolation of specifically interacting proteins. *Biochemie* **53**. 603.

Borek, F. Stupp. Y. and Sela M. (1967). Formation and isolation of rabbit antibodies to a synthetic antigen of low molecular weight. *J. Immunol.* **98**, 739.

Borek, F. and Fabian, D. (1970). The use of a cellulose derived immunoadsobent for the purification of guinea-pig antitrinitrophenyl antibody. *Immunochemistry* **7**, 319.

Carrel, S. and Barandun. S. (1971). Protein-containing polyacrylamide gels: their use as immunoadsorbents of high capacity. *Immunochemistry* **8**, 39.

Carrel. S., Theilkäs, L., Morrel, A., Skvaril, F. and Barandun. S. (1971). Isolation of normal Ig E by means of an immunoadsorbent. *Biochem. J.* **122**, 405.

Chase M. W. and Williams. C. A. (Eds.) (1968). Methods in immunology and immunochemistry. Vol. 2, Acad. Press.

Cohn, E. J., et al. (1946). Preparation and properties of serum and plasma proteins IV. *J. Amer. Chem Soc.* **68**, 459.

Dandliker. W. B., and Saussure, V. A. de (1968). Antibody purification at neutral pH utilizing immunospecific adsorbents. *Immunochemistry* **5**, 357.

Fahey, J. L., Frankin, E. C.. Nezlin, R. S. and Webb, T, (1966). Antibody purification on insoluble adsorbents and purification and characterization of IgA. *Bull. Wld. Health Organizat.* **35**, 779

Gill, T. J. and Bernard, C. F. (1969). Quantitative micro-method for measuring antibody utilizing the bromoacetyl-cellulose immunoadsorbent. *Immunochemistry* **4**, 11.

Hoyer. L. W., Vannier, W. E. and Reufer. L. (1968). Antibody elution from hapten-cellulose immunosorbents: the effects of hapten structures, pH and salt concentration. *Immunochem stry* **5**, 277.

Horejsi, J. and Smetana, R. (1956). The isolation of gamma globulin from blood-serum by rivanol. *Acta Med Scand.* **155**, 65.

Joustra. M and Lundgren. H. (1969). Preparation of freeze-dried. monomeric and immunochemically pure IgG by a rapid and reproducible chromatographic technicque. Protides Biol. Fluids, Proc. 17th Colloq. Bruges.

Kabat, E. A. and Mayer, M. M. (1961). Experimental Immunochemistry. 2nd ed., Charles C. Thomas

Publ
Levy, H. B. and Sober, H. A. (1960). A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **103**, 250.
Porath, J (1967) Recent advances in separation methods. In: ''Gamma Globulins''. Nobel Sym., No. 3.
Robbins, J. B., Haimovich, J. and Sela, M. (1967). Purification of antibodies with immunoadsorbents prepared using bromoacetylcellulose. *Immunochemistry* **4**, 11
Sanderson C. J. and Wilson, D. Y. (1971). Methods for coupling protein or polysaccharide to red cells by periodate oxidation. *Immunochemistry* **8**. 163.
Skvaril F and Morell. A. (1970). The G_4 subclass in IgG fractions prepared by ionexchange chromatography. *J. Immunol.* **104**, **1310**.
Stechschulte, D. G. and Austen, K. F. (1970). Immunoglobulins of rat colostrum. *J. Immunol.* **10** 4. 1052.
Vannier. W. E. Brien, W P, and Campbell, D. H. (1965). The preparation and properties of a hapten-cellulose antiboody adsorbent. *Immunochemistry* **2**, 1.
Van der Hoven, A., Conradie, J. D and Bubb, M (1973). The isolation of immunologically pure IgM from Cohn fraction III of pooled normal human serum. *Immunoch emistry* **10**; 107.
Wofsy, L. and Burr, B. (1969) The use of affinity chromatography for the specific purification of antibodies and antigens. *J. Immunol.* **103** 380
Zschocke, R H., Griebe, H. G., Back, G. L. and Anderson, T. O. (1969). Studies on IgA. I. Fractionation procedure for isolation of IgA from pooled normal human plasma *J. Immunol.* **102**, 625.
Гурвич, А. Е., Кузоклева о. б. Туманова, А. Е.. (1961). Получение белковоцеллюлозных комплексов (иммуносорбентов) в виде суспензий,способных присоединять большие количества антител *Биохимия* **26**, 934.

抗体的不均一性和均一的抗体

Braun, D. J. Huser, H., and Jaton, J-C. (1975). Identical sequence of light chains from rabbit anti-streptococcal antibodies. *Nature* **258**, 363.
Brient. B. W. and Nisonoff, A. (1970). Inhibition by specific hapten of the reactions of idiotypic anti-p-azobenzoate antibody with anti-idiotypic antiserum. *Fed. Proc.* **29**. 773.
Brient. B. W., Haimovich J. and Nissonoff, A. (1971). Reaction of anti-idiotypic antibody with the hapten binding site of a myeloma protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **68**, 3136.
Edelman, G. M. and Gally, G .A. (1962). The nature of Bence-Jones proteins, chemical similarities of polypeptide chains of myeloma globulins and abnormal γ-globulins. *J. Exp. Med.* **116**, 207.
Eisen, H. N. Michealides, M. C., Underdown, B. J., Schulenberg, E. P. and Simms. E. S. (1970). Myeloma proteins with antibody activity. *Fed. Proc* **29**. 78
Freedman, M. Merrett, R. and Pruzonski. W. (1976). Human monoclonal immunoglobulins with antibody-like activity. *Immunochemistry* **13**, 193.
Fleischman, J. B. (1971). A partial amino acid sequence in the heary chain of a rabbit antibody to group C streptococcal carbohydrate. *Biochemistry* **10**, 2753.
Fleishman, J. B. (1973). Amino acid sequences in the Fd of a rabbit antibody heavy chain. *Immunochemistry* **10**, 401.
Grubb, R. (1970). The genetic markers of human gamma-globulins. Springer.
Haber, E. (1970). Antibodies of restricted heterogeneity for strucral study. *Fed. Proc.* **29**, 66.
Hood, L. and Talmage D. W. (1970). Mechanism of antibody diversity: germ line basis for variability. *Science* **168**, 325.
Krause. R. M. (1970). The search for antibodies with molecular uniformity. *Advance in Immunol.* **12**, 1.
Kunkl. H. G. Mannik, M. and Williams, R. C. (1963). Individual antigenic specifities of isolated antibodies. *Science* **140**, 1218.
Kunkl, H. G. Allen, J. C., Grey, H. M. Martensson, L. and Grubb, R. A. (1964). A relationship between H-chain groups of 7S γ-globulin and the Gm system. *Nature* **203**. 413.
Kunkl. H. G., Killander. J. and Mannik. M. (1966). Current trends in immunoglobulin research. *Acta Med. Scand. Suppl.* **445**, pp. 63—73.
Kunkl, H. G. and Yount, W. J. (1970). Heavy-chain subgroups of γG, γA globulins. In: ''Immunoglobulins'', p. 137.
McDonald, A. B. and Nissonoff, A. (1970). Quantitative studies of idotypic antibodies. III. Persistence and variations of idotypic specificites during the course of immunization. *J. Exp. Med.* **131**.

583
Milstein, C. (1967). Linked groups of residues in immunoglobulin k-chains. *Nature* **216**. 330
Oudin, J. (1966). Genetic regulation of immunoglobulin synthesis. *J. Cell Physiol.* **67**, Suppl 1. 77.
Ouidin, J. and Michel, M. (1969). Idiotypy of rabbit antibodies. I. Comparison of idiotypy of antibodies against *Salmonella typhi* with that of antibodies against *S. typhi* in other rabbits. *J. Exp. Med.* **130**. 595.
II. Comparison of idiotypy of various kinds of antibodies formed in the same rabbit against S. typhi. *J. Exp. Med.* **130**, 619.
Potter, M. (1970). Mouse IgA myeloma proteins that bind polysaccharide antigens of enterobacterial origin. *Fed. Proc.* **29**, 85.
Rovis, L., Kabat E. A. and Potter, M. (1972). Immunochemical studies on a mouse myeloma protein having specific binding affinity for 2-acetamido-2-deoxy-D-mannose. *Carbohydrate Res.* **23**, 223.
Spring-Stewart, S. and Nissonoff, A. (1973). Effect of blocking the active site of an antibody on the expression of its idiotypic determinants during immunization. *J Immunol.* **110**, 679.
Vicari, G., Sher, A., Cohn, M. and Kabat, E. A. (1970). Immunochemical studies on a mouse myeloma protein with specificity for certain β-linked terminal residues of N-acetyl-D-glucosamine. *Immunochemistry* **7**, 829.
WHO. (1965). Notation for genetic factors of human immunoglobulins. *Bull. W. H. O.* **33**. 721
Yount, W. J., Dorner, M. M. Kunckl, H. G. and Kabat, E. A. (1968) Studies on human antibodies. VI. Selective variations in subgroup compositions and genetic markers. *J Exp. Med.* **127**, 633.

第七章　免疫球蛋白G的结构和功能

几类抗体中，IgG 的含量最高，研究也最清楚，可作为几类免疫球蛋白结构和功能的代表。

一、分子的基本结构

根据 G. Edelman (1959) 的研究，IgG 分子是由四条多肽链，两条重链和两条轻链，靠二硫键连接而成的。如果在酸性条件下 (pH2.5)，用 SH 试剂(如巯基乙醇等)使重链间的二硫键还原，抗体就解离为两个相等的半分子。每个半分子具有一个抗原结合位点。如果在有 SH 试剂存在时，再用尿素或氯化胍处理，每一个半分子进一步解离为一条重链和一条轻链，同时失去结合抗原的能力。如果用烷化剂(碘乙酸酰胺，碘乙酸等)使肽链的 **SH** 基团烷基化，防止被还原了的连接重链和轻链的二硫键的重新形成，而使重链和轻链处于游离状态，于是就可以通过葡聚糖凝胶过滤，依据两种链的分子量的不同，而把它们分离(图 7-1)。依来源而定，轻链的分子量为 20,000—24,000，含有约 210—230 氨基酸单位；重链分子量约为 5,5000—60,000，约含 420—430 氨基酸单位。

R. R. Porter (1959) 发现家兔 IgG 可被蛋白酶(木瓜酶)分解为三个大小约相等的片段(图 7-2)。其中两个片段，"抗原结合片段"，称为 Fab，是相同的；第三个片段，"结晶片段"，称为 Fc，和前两个片段的性质不同。Fab 能和抗原结合，但不能共同形成沉淀。这是因为每一个 Fab 片段只有一个抗原结合位点，或者说它的结合抗原能力是单价

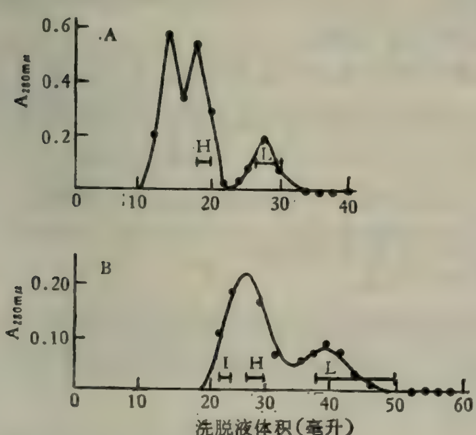


图 7-1　还原和烷基化的抗体重链和轻链经 Sephadex G-100 凝胶过滤分离 (0.5*N* 丙酸) (A) 还原和烷基化的抗 f_1 噬菌体抗体。(B) 还原和烷基化的抗 f_2 噬菌体抗体。I 为重链的聚集物　H 为重链　L 为轻链(据 Edelman 等,1963)。

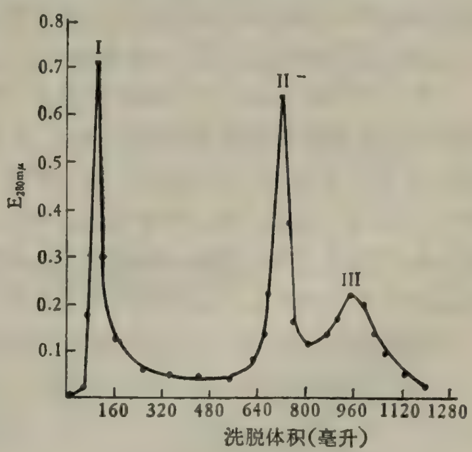


图 7-2　家兔 IgG 木瓜酶酶解片段用 CM-纤维素层析分离。洗脱液梯度：0.1*M*醋酸钠 (pH5.5)→0.9*M*醋酸钠(pH5.5)；I,II 为 Fab (分子量＝50,000—55,000)；III 为 Fc (分子量＝80,000)(据 Porter, 1959)。

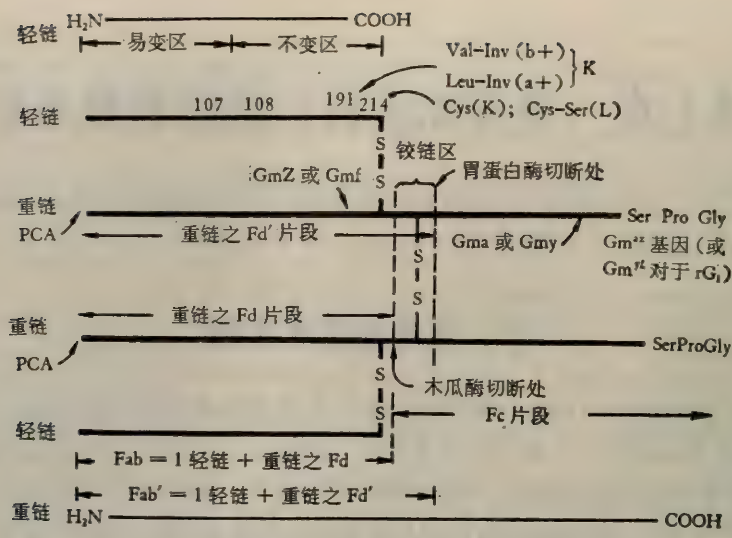


图 7-3 IgG 免疫球蛋白之基本的四链构造(据 Kabat, 1971)。

的;而原抗体分子有两个 Fab 片段,也就有两个抗原结合位点,或者说是双价的。Fc 片段易于形成结晶,由此推测构成 Fc 片段的重链部分在所有抗体分子可能是相同的。如改用胃蛋白酶,则把 IgG 抗体分子切断成大小不等的两个片段。小的片段类似 Fc, 称为 Fc 。大的片段(5S)是一个双体,称为 $F(ab')_2$。经 SH 试剂(如巯基乙醇等)处理使二硫键还原,就可产生两个 3.5S 片段 F(ab′)。5S 片段能和两个抗原分子结合,而 3.5S 片段只能和一个抗原分子结合。所有 Fab′ 片段的专一性是相同的,表明原来抗体分子的两个结合位点的专一性是相同的。木瓜酶的专一性不高,可能水解许多肽键。然而,IgG 的重链只能在近中段处(219 残基位置)被切断,其他部位酶不能接近。结合其他方面的证据,因而推测 IgG 分子是由三个致密的集团(2Fab, Fc),通过两条短而柔曲的部分——所谓“铰链区”(“Hinge region”)而连接在一起的。

将上述抗体 IgG 分子肽链的拆合和酶解实验结果合并起来考虑,就可以得出 IgG 抗体分子基本构造的模式图(图 7-3)。从图上可见,木瓜酶在连接两条重链的靠 N 端处(219 位置)将抗体分子切成 Fc 和 2Fab 片段。其中,Fc = 重链靠 C 端的一半,而 Fab = 1 轻链 + 重链 Fd(靠 N 端的一半)。胃蛋白酶的作用点在连接两条重链的二硫键的靠 C 端处(232 位置),结果这个二硫键得以保留在 5S 片段上并把两个 F(ab′)连接起来成为 $F(ab')_2$,因而保留着两个抗原结合位点。

根据这些实验事实,关于抗体分子的结构和功能的关系可以得出重要的结论:

1) 由于抗体分子失去 Fc′ 片段后,不影响和抗原的结合,因此抗原结合位点应位于 $F(ab')_2$ 上。每一个 Fab′ 有一个专一性相同的结合位点;

2) 重链和轻链拆开后就失去结合抗原的能力。因此,抗原结合位点的功能依赖于这两条链共同形成的结构;

3) Fc 含有分子的大部分糖基团。Porter (1962) 认为 Fc 的功能可能和固定补体有关系。

在此之前,Ishizaka (1961) 已提出 IgG 固定补体的功能可能位于 Fc,而不位于

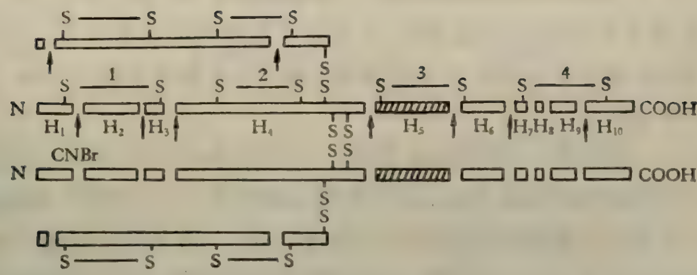


图 7-4 一种髓细胞瘤 IgG (MOPC 173 γG2a) 之 CNBr 片段的固定补体活力存在于 H₅ 片段(据 Kehoe 和 Fougereau, 1970)。

表 7-1 一种 IgG (MOPC173 γG2a) 及其片段的补体结合的测定
(固定 C, H—50 单位/50 微克蛋白质)

样 品	1*	2*	3**	4**	5**	6**
γG	10.89	14.36	17.17	13.82	12.82	12.94
H4	1.82	—	—	—	—	—
H5	10.30	4.12	9.40	11.03	11.04	9.84
H6	2.54	2.95	2.85	2.96	—	3.40
H9	—	0.50	0.73	—	—	0.70
BSA	—	0.00	1.03	—	—	—

* 吸附在聚苯乙烯颗粒上，4℃(据 Kehoe 和 Fougereau, 1970)。
** 同上，20℃。

Fab 的证据。和聚集的 IgG 分子一样，聚集的 Fc 能固定补体，而聚集的 Fab 或 $F(ab')_2$ 都不能。后来进一步确定了固定补体功能在 Fc上的位置是在重链从 N 端起第三个链内二硫环的“H5”肽段(包括大约 50 氨基酸残基，分子量约为 7,000)。“H5”应具有和补体系统的一个成分结合的受体部位（图 7-4；表 7-1）（Utsumi, 1969; Kehoe 和 Fougereau, 1970)。

这些事实提示抗体分子的功能有区域分化，结合抗原的功能和效应功能(固定补体)位于分子的不同部位。

二、免疫球蛋白一级结构的测定方法

已知蛋白质的立体结构依赖于参与组成的多肽链的一级结构。当了解免疫球蛋白的基本肽链组成后，下一步最基本的也是最艰巨的工作是测定重链和轻链的氨基酸排列顺序。在证明 Bence-Jones 蛋白质是均一的轻链以后，许多实验室开始了对这一蛋白质的氨基酸排列顺序的研究。

多肽链氨基酸排列顺序测定的基本方法，如图 7-5 所示，包括两道步骤。

第一道步骤 多肽链经溴化氰（CNBr）裂解，并确定产生的片段的次序（1)。溴化氰在链 a 的甲硫氨酸残基位置切断，甲硫氨酸被转化为高丝氨酸(HSR)（1b)。由于 IgG 分子所含甲硫氨酸残基数目不多，可以得到少数几个较大的片段，如轻链被切成三段，重

链被切成七段。再用 Sephadex 凝胶过滤分离这些肽段，测定其末端的氨基酸排列顺序（1c）。另一方面，链 a 改用胰蛋白酶切断，分离含甲硫氨酸的酶解片段（1d），测定其排列顺序，并和 CNBr 裂解片段末端的排列顺序相比较，由此确定这些 CNBr 裂解片段在原多肽链上连结的先后次序。

第二道步骤　测定每一段 CNBr 裂解片段的氨基酸排列顺序。这可以采用 Sanger 测定胰岛素一级结构的经典方法，先用胰蛋白酶分解一个 CNBr 裂解片段（2a），测定所产生的每一段胰蛋白酶酶解片段的排列顺序（2b）。再和同一肽段（2a）用胰凝乳蛋白酶酶解片段的排列顺序（2c）相比较，以决定胰蛋白酶酶解片段在原肽段（2a）上的先后次序。最后，再把所有这些片段的排列顺序，互相核对，依次排列起来，就得到整个多肽链的排列顺序。

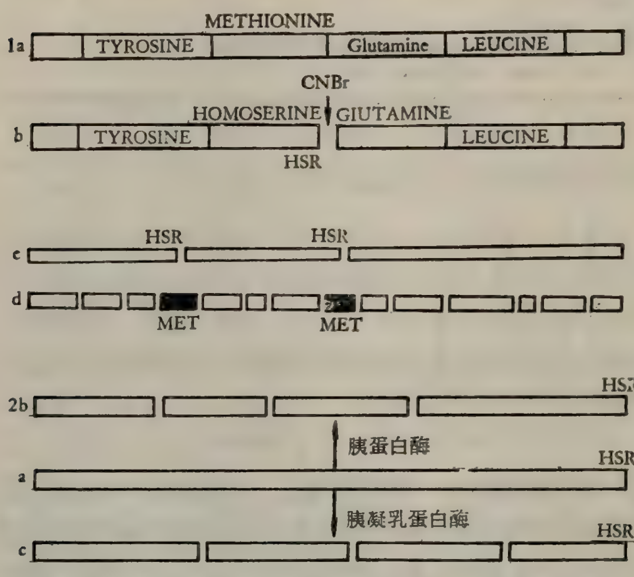


图 7-5　肽链的初级结构测定的“两步法”。（1）抗体的肽链经 CNBr-裂解，并决定产生的片段的次序。（2）测定每一段 CNBr 片段的氨基酸排列顺序（据 Edelman, 1970）。

许多实验室对几十种 Bence-Jones 蛋白质一级结构测定的结果，发现没有任何两个人产生的 Bence-Jones 蛋白质的一级结构是相同的。每一种都有其独特的氨基酸排列顺序。然而，对许多种 Bence-Jones 蛋白质排列顺序的比较，却显出一定的特征。每一个分子是由大约 214 氨基酸残基组成的，从 N 端算起的 109 位置开始，各种 Bence-Jones 蛋白质具有大体相同的排列顺序，称为不变区（Constant region）。与此相反，各种 Bence-Jones 蛋白质前 108 氨基酸残基的排列有很大变化，各不相同，称为易变区（Variable region）（Hilschmann 和 Craig, 1965）。后来对髓细胞瘤蛋白质重链的研究表明也可分为不变区和易变区。重链和轻链的这种结构上的分化对于了解抗体分子的功能分化和遗传控制是一个很重要的基本事实。这在后面还要详细讨论。

三、二硫键及“铰链区”的特性

（一）链间和链内二硫键

IgG 分子有 12—16 个链内二硫键（轻链有 2—3 个，重链有 4—5 个），以及 3 个以上的链间二硫键。人和动物的 IgG 各亚类的链间二硫键有很大变异，数目和位置都有不同（图 7-6；表 7-2）（Frangione 等，1968；Milstein 和 Pink，1970）。

人 IgG_1 分子有 4 个链间二硫键，其中 2 个连接重链和轻链，2 个连接两条重链。木

表 7-2 人和各种动物 IgG 重链间二硫桥数目的变异

免疫球蛋白	重链间二硫桥数目	免疫球蛋白	重链间二硫桥数目
IgG_1 人	2	IgG_1 小鼠	3
IgG_2 人	4	IgG_2a 小鼠	3
IgG_3 人	5	IgG_2b 小鼠	4
IgG_4 人	2		
		IgG_2 豚鼠	3
		IgG_2 家兔，山羊	1

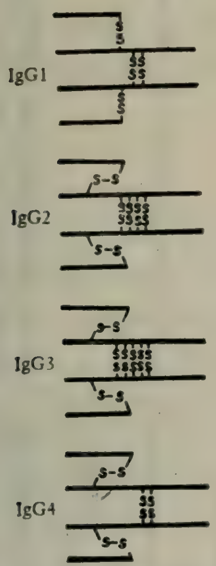


图 7-6 人类 IgG 各亚类的链间二硫键排列(据 Milstein 和 Pink, 1970)。

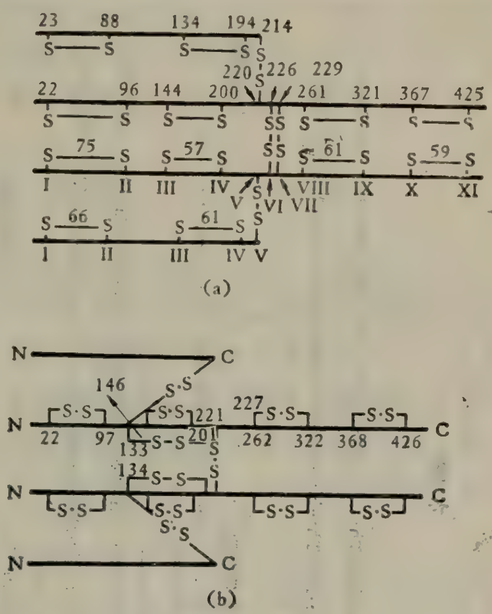


图 7-7 IgG 分子内二硫键的排列。(a) 人 IgG_1K (Gall 和 Edelman, 1970)。(b) 家兔 IgG (O'Donnell 等, 1970)。阿拉伯数字表示半胱氨酸残基在肽链上的位置。罗马数字表示这些残基在重链和轻链上的顺序。

瓜酶消化时，γ_1 链在连接重链和轻链的二硫键与连接重链本身的二硫键之间的地方水解。胃蛋白酶处理时，则在连接重链本身的二硫键靠 C 端一侧酶解(图 7-6)

IgG_4 和 IgG_1 一样，具有 2 个重链间二硫键和 2 个重链和轻链间二硫键；不过后者在重链上的位置不同，更靠近 N 端 (Frangeone 等, 1969; Pink 等, 1970)。

IgG_3 和 IgG_1 有很大的区别。它共有 7 个二硫键，其中 5 个为连接重链本身之间的。连接重链和轻链之间的半胱氨酸残基在 γ_3 链上的位置和在 γ_4 链上相同，都比较靠近 N 端。 γ_3 链上重链间第一个二硫键的位置相当于 γ_1 链上连接重链和轻链间的半胱氨酸残基的位置。胰蛋白酶能在两个重链间的二硫键之间将 γ_3 链切断。显然，这两个重链间二硫键应是彼此平行的。

IgG_2 分子共有 6 个二硫键，其中 4 个是连接重链间的。连接重链和轻链间二硫键的半胱氨酸残基附近的排列顺序与 IgG_3, IgG_4 相同。但是连接 γ_2 重链间二硫键附近的排列顺序，和其他亚类重链在该区域的排列顺序有很大的不同。 参与这些重链间二硫键

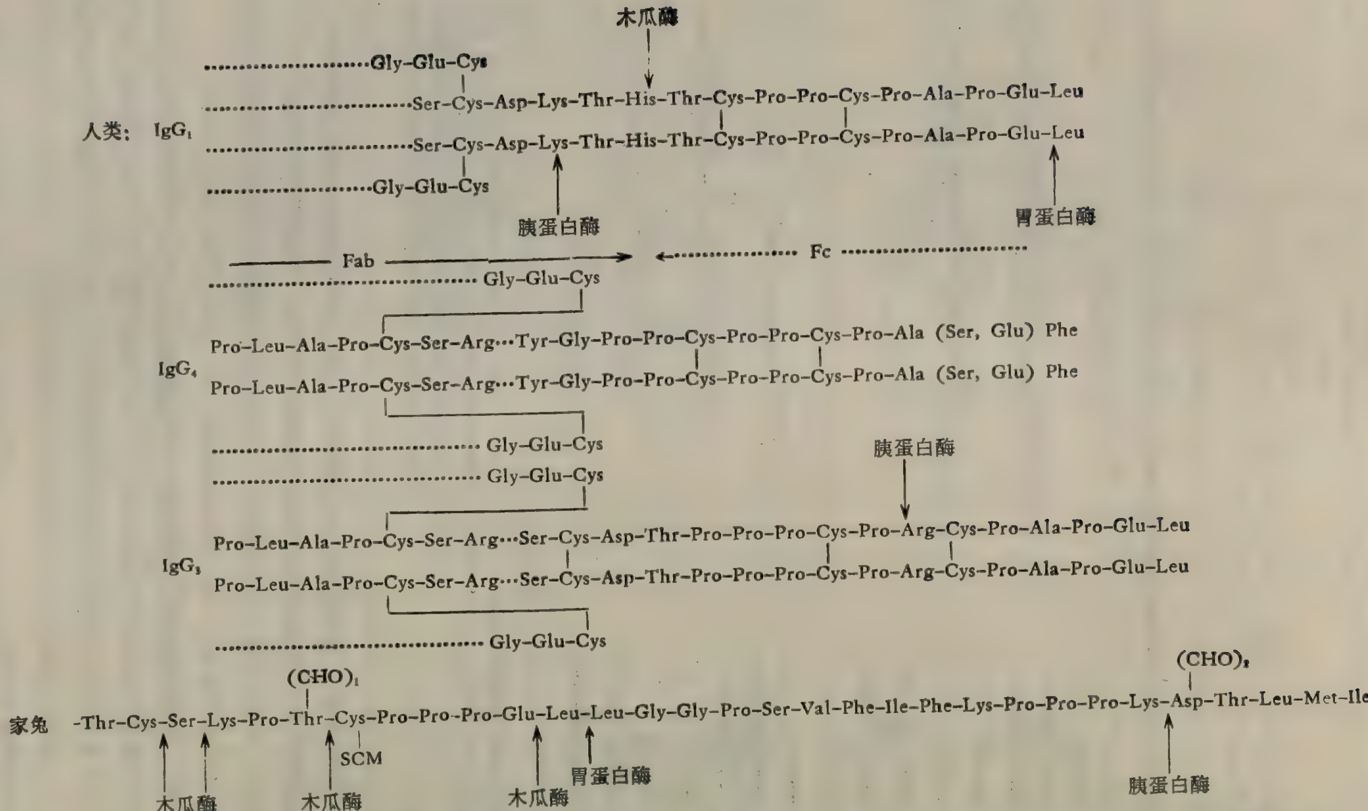


图 7-8 人 IgG 各亚类及家兔 IgG 铰链区的排列顺序和酶解的位置。 Cys-SCM 为重链间二硫键封闭的半胱氨酸残基。 家兔重链的低聚糖基团分布有两种类型，一类如上图所示有两个低聚糖基团，另一类只有一个低聚糖基团 $(CHO)_2$。 当有 $(CHO)_1$ 存在时，木瓜酶不能切断—Thr—Cys—SCM 键（据 Nezlin, 1972; Smyth 和 Utsumi, 1967）。

组成的 4 个半胱氨酸残基，在全长 8 氨基酸残基的肽段上，彼此靠得很近。这可能是 IgG_2 亚类对木瓜酶稳定的原因。

由于人类 IgG 各亚类的 γ 重链间二硫键附近的排列顺序不同，有可能用化学方法(酶解图谱)来鉴别这些亚类 (Frangione 等，1969)。

IgG 分子有 12—16 个链内二硫键，轻链 (κ 或 λ) 上有 2—3 个，重链上有 4—5 个。如图 7-7(a) 所示，在人类 IgG 的多肽链上，它们呈周期性排列，结果每一个链内二硫环内包含大约等长的肽段 (60—70 残基) (Gall 和 Edelman, 1970)。家兔 IgG 大体上也保持这样的规律性，不过 Fd 片段的近 C 端半段有附加的一个链内二硫键 (图 7-7(b))。家兔某些类型的轻链 (λ 和 κA) 也有两个链内二硫键，而另一亚型的轻链 κB 则有 3 个链内二硫键 (Rejnek 等，1969)。如在下文中将见到的，链内二硫环的这种周期性分布，对于抗体分子结构和功能的分化有重要的意义。

(二) "铰链区"的特性

IgG 分子是由三个致密的球 (2Fab, Fc)，通过短而柔曲的"铰链区"连接起来的。"铰链区"的存在使抗体分子得到分节柔曲性(见 220 页)，并易于被酶解。"铰链区"的这种特性是和其一级结构的特点有密切关系的。首先，重链间二硫桥多集中在这一区域，彼此平行的排布。其次，这里还存在相当多的不常见的脯氨酸。某些物种，如家兔，还可能存在 1 或 2 个低聚糖基团(图 7-8)。由于这些一级结构特性的限制，尤其是重链间二硫桥的排布，以及脯氨酸的存在，妨碍了螺旋构造的形成，结果这一段肽链不能盘绕成二级结构，因而能保持相当的柔曲性，并易于被各种专一性不同的蛋白酶接近。

此外，"铰链区"本身的长度也有很大的变异，例如，和人的 γ_1 链比较，家兔的 γ 链在此区域少 4 个残基 (224, 229, 230, 231)，山羊要少 9 个残基 (223, 229—236)，并且低聚糖基团的数目和位置也可能不同。

四、IgG 分子的全部一级结构

在上述工作的基础上，G. Edelman 等 (1969) 测定了一种髓细胞瘤蛋白质 IgG_1 (Eu) 的全部氨基酸排列顺序和二硫键的位置，可代表 IgG 的化学结构。IgG_1 (Eu) 的分子量为150,000，比胰岛素大 25 倍，其重链有 446 氨基酸残基，轻链有 214 氨基酸残基，共计 1,320 氨基酸，包含 19,996 个原子。

分子结构如图 7-9 所示，如早期研究提示的，分子是由两条相同的轻链和两条相同的重链组成的。分子的构造是对称的，每一个半分子由一条轻链和一条重链构成。每一条轻链和相邻的重链由一个二硫键 (V) 连接成一个半分子。两个半分子之间，再由 VI, VII 两个二硫键连接起来。在每条链内，每隔大约相等的距离也形成类似的链内二硫键，结果大约把轻链等分为两段，重链分为大约相等的四段。胰蛋白酶能在重链的 222 位置的赖氨酸残基处将多肽链切断，形成两个 Fab(t) 和一个 Fc(t) 片段。轻链的全部氨基酸 (214 残基)的排列顺序见图 7—10。根据和其他许多种 Bence-Jones 蛋白质氨基酸排

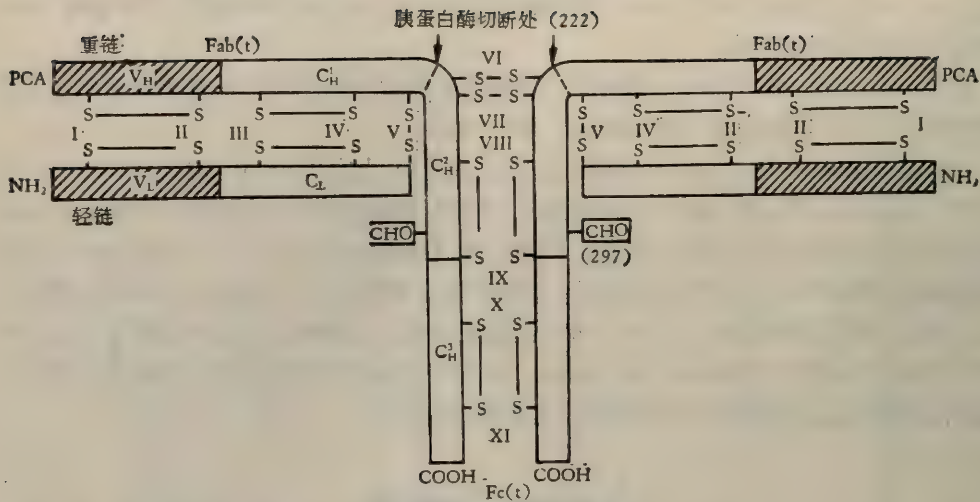


图 7-9 γG_1 免疫球蛋白（Eu）的肽链和二硫键排列。半胱氨酸残基，从N端起始，用 I—XI 表示。↑为分子在重链的 222 位置被胰蛋白酶切断成两个“抗原结合”片段和一个“可结晶”片段。（V_H, V_L）重链和轻链的同源的易变区；（C_H^1，C_H^2，C_H^3）重链不变区的同源区；（C_L）轻链与 C_H^1，C_H^2，C_H^3 的同源区；（PCA）吡咯烷酮羧酸（Pyrollidonecarboxylic acid）；（CHO）糖基团(据 Edelman 等，1969)。

1 10 20
Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Thr-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val-Thr-

30 40
Ile-Thr-Cys-Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-Ile-Asn-Thr-Trp-Leu-Ala-Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-

50 60
Gly-Lys-Ala-Pro-Lys-Leu-Leu-Met-Tyr-Lys-Ala-Ser-Ser-Leu-Glu-Ser-Gly-Val-Pro-Ser-

70 80
Arg-Phe-Ile-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Glu-Phe-Thr-Leu-Thr-Ile-Ser-Ser-Leu-Gln-Pro-

90 100
Asp-Asp-Phe-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Tyr-Asn-Ser-Asp-Ser-Lys-Met-Phe-Gly-Gln-

110 120
Gly-Thr-Lys-Val-Glu-Val-Lys-Gly-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-

130 140
Ser-Asp-Glu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Thr-Ala-Ser-Val-Val-Cys-Leu-Leu-Asn-Asn-Phe-Tyr-

150 160
Pro-Arg-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Trp-Lys-Val-Asp-Asn-Ala-Leu-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser-Gln-

170 180
Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Gln-Asp-Ser-Lys-Asp-Ser-Thr-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-

190 200
Leu-Ser-Lys-Ala-Asp-Tyr-Glu-Lys-His-Lys-Val-Tyr-Ala-Cys-Glu-Val-Thr-His-Gln-Gly-

214

210
Leu-Ser-Ser-Pro-Val-Thr-Lys-Ser-Phe-Asn-Arg-Gly-Glu-Cys

图 7-10 IgG_1(Eu) 轻链的全部氨基酸排列顺序(据 Edelman，1969)。

列顺序的比较可看出，轻链的易变区（V_L）从 N 端起始，延长到 108 位置。191 位置的 Val 和 Inv(b^+) 抗原专一性有关系。重链的全部氨基酸（446 残基）的排列顺序见图 7-11。356 位置的 Glu 和 358 位置的 Met 可能和 Gm(1) 专一性有关系；214 位置的 Arg 可能和Gm(4)专一性有关系。从分离出的一个糖多肽的分析表明，分子的糖基团是和 227 位置的 Asx 连接。比较 IgG_1（Eu）重链从 101—121 的排列顺序和另一种髓细

1 10 20
Dca –Val –Gln–Leu –Val –Gln –Ser –Gly–Ala –Glu–Val –Lys –Lys –Pro –Gly–Ser –Ser –Val –Lys–Val

30 40
Ser –Cys–Lys–Ala –Ser –Gly –Gly –Thr–Phe –Ser –Arg–Ser–Ala –Ile –Ile –Trp –Val–Arg–Gln–Ala –

50 60
Pro –Gly –Gln–Gly –Leu –Glu –Irp –Met–Gly –Gly–Ile –Val –Pro –Met–Phe–Gly –Pro–Pro–Asn–Tyr –

70 80
Ala –Gln –Lys–Phe –Gln –Gly –Arg –Val–Thr –Ile –Thr–Ala–Asp–Glu–Sre –Thr –Asn–Thr–Ala–Tyr –

90 100
Met –Glu –Leu–Ser –Ser –Leu –Arg –Ser –Glu –Asp–Thr –Ala –Phe–Tyr–Phe–Cys–Ala –Gly –Gly–Tyr –

110 120
Gly –Ile –Tyr–Ser –Pro –Glu –Glu –Tyr–Asn –Gly–Gly –Leu–Val –Thr–Val –Ser –Ser –Ala –Ser –Thr –

130 140
Lys –Gly –Pro–Ser –Val –Phe –Pro –Leu–Ala –Pro –Ser –Ser –Lys –Ser –Thr–Ser –Gly –Gly–Thr –Aal–

150 160
Ala –Leu–Gly–Cys–Leu –Val –Lys –Asp –Tyr –Phe –Pro –Glu–Pro –Val –Thr–Val –Sre–Trp –Asn–Ser –

170 180
Gly –Ala –Leu–Thr –Ser –Gly –Val –His –Thr –Phe –Pro –Ala –Val –Leu–Gln–Ser –Ser –Gly–Leu–Tyr –

190 200
Ser –Leu –Ser –Ser –Val –Val –Thr –Val–Pro –Ser –Ser –Ser –Leu–Gly–Thr–Gln –Thr–Tyr–Ile –Cys–

210 220
Asn –Val –Asn–His –Lys –Pro –Ser –Asn–Thr –Lys –Val –Asp–Lys –Arg–Val –Glu –Pro –Lys –Ser –Cys–

230 240
Asp –Lys –Thr–His –Thr –Cys–Pro –Pro–Cys–Pro –Ala –Pro –Glu–Leu–Leu –Gly –Gly –Pro –Ser –Val –

250 260
Phe –Leu –Phe–Por –Por –Lys –Pro –Lys –Asp –Thr –Leu–Met–Ile –Ser –Arg–Thr –Pro –Glu–Val –Thr –

270 280
Cys–Val –Val –Val –Asp –Val –Ser –His –Glu –Asp–Pro –Gln–Val –Lys –Phe–Asn –Trp–Tyr –Val –Asp –

290 300
Gly –Val –Gln–Val –His –Asn –Ala –Lys –Thr –Lys –Pro –Arg–Glu–Gln–Gln–Tyr –Asx–Ser –Thr–Tyr –

310 320
Arg –Val –Val –Ser –Val –Leu –Thr –Val –Leu –His –Gln–Asn–Trp–Leu–Asp–Gly –Lys –Glu–Tyr –Lys –

330 340
Cys–Lys –Val –Ser –Asn –Lys –Ala –Leu–Pro –Ala –Pro –Ile –Glu–Lys –Thr–Ile –Ser –Lys –Ala –Lys –

350 360
Gly –Gln –Pro–Arg –Glu –Pro –Gln –Val–Tyr –Thr –Leu–Pro –Pro –Ser –Arg–Glu –Glu–Met–Thr –Lys –

370 380
Asn –Gln –Val –Ser –Leu –Thr –Cys–Leu–Val –Lys –Gly –Phe–Tyr–Pro –Ser –Asp –Ile –Ala –Val –Glu –

390 400
Trp –Glu –Ser –Asn –Asp –Gly –Glu –Pro –Glu –Asn–Tyr–Lys –Thr–Thr–Pro –Pro –Val –Leu–Asp–Ser –

410 420
Asp –Gly –Ser –Phe –Phe –Leu –Tyr –Ser –Lys –Leu–Thr–Val –Asp–Lys –Ser –Arg –Trp–Gln–Glu–Gly –

430 440
Asn –Val –Phe–Ser –Cys–Ser –Val –Met–His –Glu–Ala –Leu–His –Asn–His –Tyr –Thr–Gln–Lys–Ser –

446
Leu –Ser –Leu–Ser –Pro –Gly

图 7-11 IgG_1(Eu) 重链的全部氨基酸排列顺序。(半胱氨酸残基在方框内，甲硫氨酸加底线)(据 Edelman, 1969)。

胞瘤蛋白质 IgG(He) (Gm 专一性和 Eu 相同)重链的相对应的一段的排列顺序：

101 105 110 115 120
Eu: –Gly –Ile –Tyr–Ser –Pro–Glu–Glu–Tyr–Asn–Gly–Gly–Leu–Val–Thr–Val–Ser–Ser–Ala–Ser–Thr–Lys–

He: –Thr–Leu–Ala–Phe–Asx–Val–Try–Gly–Glx–Gly–Thr–Lys–Val–Ala–Val–Ser–Ser–Ala–Ser–Thr–Lys–

可以看出，从 115 位置开始氨基酸排列顺序相同。后来进一步的研究证明这两种重链从 115—252 的排列顺序都相同。此外，Eu 和 He 之 Fc 片段的酶解肽段“指纹”图

										1									10
Eu U_L (残基 1—108)										Asp	Ile	**Gln**	Met	Thr	**Gln**	**Ser**	Pro	Ser	Thr
Eu U_H (残基 1—114)										Pca	Val	**Gln**	Leu	Val	**Gln**	**Ser**	Gly	—	Ala
									20										30
Leu	Ser	Ala	Ser	Val	**Gly**	Asp	Arg	**Val**	Thr	Ile	Thr	**Cys**	Arg	**Ala**	**Ser**	Gln	Ser	Ile	Asn
Glu	Val	Lys	Lys	Pro	**Gly**	Ser	Ser	**Val**	Lys	Val	Ser	**Cys**	Lys	**Ala**	**Ser**	Gly	Gly	Thr	Phe
										40									
Thr	—	—	Trp	Leu	Ala	**Trp**	Tyr	Gln	**Gln**	Lys	**Pro**	**Gly**	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Met
Ser	Arg	Ser	Ala	Ile	Ile	**Trp**	Val	Arg	**Gln**	Ala	**Pro**	**Gly**	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
	50											60							
Tyr	Lys	Ala	Ser	Ser	—	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	**Phe**	Ile	**Gly**	Ser	Gly	Ser
Gly	Ile	Val	Pro	Met	Phe	Gly	Pro	Pro	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	**Phe**	Gln	**Gly**	—	Arg	Val
		70																	80
Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	—	—	—	—	—	—	—	Leu	Thr	Ile	**Ser**	**Ser**	**Leu**	Gln	Pro
Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	**Ser**	**Ser**	**Leu**	Arg	Ser
									90										
Asp	**Asp**	Phe	**Ala**	Thr	**Tyr**	Tyr	**Cys**	Gln	Gln	—	**Tyr**	Asn	Ser	Asp	**Ser**	Lys	Met	Phe	Gly
Glu	**Asp**	Thr	**Ala**	Phe	**Tyr**	Phe	**Cys**	Ala	Gly	Gly	**Tyr**	Gly	Ile	Tyr	**Ser**	Pro	Glu	Glu	Tyr
100																			
Gln	**Gly**	Thr	Lys	**Val**	Glu	Val	Lys	Gly											
Asn	**Gly**	Gly	Leu	**Val**	Thr														

图 7-12 人 IgG(Eu) 易变区 V_L 和 V_H 氨基酸排列顺序的比较。为了得到最大同源性，引入的缺失肽段用虚线表示。相同的残基用黑体字表示(据 Edelman, 1971)。

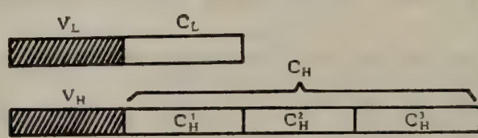


图 7-13 IgG 分子内部的同源。易变区 V_L 和 V_H 同源，重链的不变区 C_H 分为大约相等的三段 (C_H^1, C_H^2, C_H^3) 彼此同源，并且和轻链的 C_L 同源。重链的 F_C 是由同源区 C_H^2 和 C_H^3 组成的(据 Edelman, 1971)。

谱也相同。根据所有这些材料推论，重链的易变区 (V_H) 和不变区 (C_H) 的转折点应在 114 位置附近。

IgG_1(Eu) 分子结构的最显著的特点是重链和轻链都可区分为易变区和不变区两部分。重链的易变区 (V_H) 和轻链的易变区 (V_L) 的长度大约相等。当把各种免疫球蛋白易变区的氨基酸排列顺序，按尽可能有最大的同源性(即在各排列位置上有尽可能多的相同的残基)排列，并留出一些缺失(或插入的)肽段就可以发现，各种免疫球蛋白的易变区的氨基酸排列尽管有高度的变异性，但是 V_H 和 V_L 仍有一定的同源性(图 7-12)。V_H 和 V_L 位于 Fab 片段的近 N 端半段，相当于抗原结合位点的位置。由此可以假定，抗体的抗原结合位点的专一性可能依赖于重链和轻链易变区的氨基酸排列顺序。这些排列顺序的多变性提供了专一的免疫反应所需的多种多样的结合专一性。

另一个值得注意的特点，是在比较不变区的排列时可以发现内部的周期性。实际上，这在前述链内二硫环的等距分布现象中已经反映出来了(图 7-9)。如果按链内二硫环的位置把重链的不变区分为大约相等的 C_H^1、C_H^2、C_H^3 三段，并按最大同源性的方式排列。比较这三段的氨基酸排列顺序就会发现一个奇异的现象，C_H^1、C_H^2，C_H^3 的排列顺序很相似，有高度的同源性 (22—24 /100 氨基酸残基排列位置相同)，而每一段又是和轻链的 C_L 同源的(图 7-13；图 7-14)。这种同源性很可能不是偶然的，而是反映了抗体分子各同源区在进化起源上的关联。

									110										120	
Eu C_L (残基109—214)								Thr	Val	Ala	Ala	**Pro**	**Ser**	**Val**	**Phe**	Ile	**Phe**	**Pro**	**Pro**	**Ser**
Eu C_H^1 (残基119—220)								Ser	Thr	Lys	**Gly**	**Pro**	**Ser**	**Val**	**Phe**	Pro	Leu	Ala	**Pro**	**Ser**
Eu C_H^2 (残基234—341)								Leu	Leu	Gly	**Gly**	**Pro**	**Ser**	**Val**	**Phe**	Leu	**Phe**	**Pro**	**Pro**	Lys
Eu C_H^3 (残基342—446)								Gln	Pro	Arg	Glu	**Pro**	Gln	**Val**	Tyr	Thr	Leu	**Pro**	**Pro**	**Ser**
											130									
	Asp	**Glu**	Gln	—	—	Leu	Lys	**Ser**	**Gly**	**Thr**	**Ala**	**Ser**	**Val**	Val	**Cys**	**Leu**	Leu	Asn	Asn	**Phe**
	Ser	Lys	Ser	—	—	Thr	Ser	Gly	**Gly**	**Thr**	**Ala**	Ala	Leu	Gly	**Cys**	**Leu**	**Val**	**Lys**	**Asp**	Tyr
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	**Met**	Ile	**Ser**	Arg	**Thr**	Pro	Glu	**Val**	**Thr**	**Cys**	Val	**Val**	Val	**Asp**	Val
	Arg	**Glu**	Glu	—	—	**Met**	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	**Ser**	Leu	**Thr**	**Cys**	**Leu**	**Val**	**Lys**	Gly	**Phe**
	140												150							
	Tyr	**Pro**	Arg	Glu	Ala	Lys	**Val**	—	—	Gln	**Trp**	Lys	**Val**	**Asp**	Asn	**Ala**	**Leu**	**Gln**	**Ser**	**Gly**
	Phe	**Pro**	**Glu**	Pro	Val	Thr	**Val**	—	—	Ser	**Trp**	Asn	Ser		**Gly**	**Ala**	**Leu**	Thr	**Ser**	**Gly**
	Ser	His	**Glu**	**Asp**	Pro	Gln	**Val**	Lys	Phe	Asn	**Trp**	Tyr	**Val**	**Asp**	**Gly**		Val	**Gln**	Val	His
	Tyr	**Pro**	Ser	**Asp**	Ile	Ala	**Val**			Glu	**Trp**	Glu	Ser	Asn	Asp		Gly	Glu	Pro	Glu
			160										170							
	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	**Glu**	**Gln**	**Asp**	**Ser**	Lys	**Asp**	**Ser**	**Thr**	**Tyr**	**Ser**	**Leu**	**Ser**	**Ser**
	—	Val	His	**Thr**	Phe	**Pro**	Ala	Val	Leu	**Gln**	**Ser**		Ser	Gly	Leu	**Tyr**	**Ser**	**Leu**	**Ser**	**Ser**
	Asn	Ala	**Lys**	**Thr**	Lys	**Pro**	Arg	**Glu**	**Gln**	**Gln**	Tyr		**Asp**	**Ser**	**Thr**	**Tyr**	Arg	Val	Val	**Ser**
	Asn	Tyr	**Lys**	**Thr**	Thr	**Pro**	Pro	Val	Leu	**Asp**	**Ser**		**Asp**	Gly	Ser	Phe	Phe	**Leu**	Tyr	**Ser**
			180										190							
	Thr	**Leu**	**Thr**	Leu	Ser	**Lys**	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	**Lys**	**Val**	**Tyr**	Ala	**Cys**	Glu	**Val**	Thr
	Val	Val	**Thr**	**Val**	Pro	Ser	**Ser**	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln		Thr	**Tyr**	Ile	**Cys**	Asn	**Val**	Asn
	Val	**Leu**	**Thr**	**Val**	Leu	His	Gln	Asn	**Trp**	Leu	Asp	**Gly**	**Lys**	Glu	**Tyr**	Lys	**Cys**	Lys	**Val**	Ser
	Lys	**Leu**	**Thr**	**Val**	Asp	**Lys**	**Ser**	Arg	**Trp**	Gln	Glu	**Gly**	Asn	**Val**	Phe	Ser	**Cys**	Ser	**Val**	Met
			200													210				
	His	Gln	Gly	**Leu**	Ser	Ser	**Pro**	**Val**	**Thr**	—	**Lys**	**Ser**	Phe	—	—	Asn	Arg	**Gly**	Glu	**Cys**
	His	**Lys**	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	**Val**	—	Asp	**Lys**	Arg	Val	—	—	Glu	**Pro**	Lys	Ser	**Cys**
	Asn	**Lys**	**Ala**	**Leu**	Pro	Ala	**Pro**	Ile	—	Glu	**Lys**	Thr	Ile	**Ser**	Lys	Ala	Lys	**Gly**		
	His	Glu	**Ala**	**Leu**	His	Asn	His	Tyr	**Thr**	Gln	**Lys**	**Ser**	Leu	**Ser**	Leu	Ser	**Pro**	**Gly**		

图7 14　人 IgG(Eu) 不变区各同源区 C_L，C_H^1，C_H^2，C_H^3 氨基酸排列顺序的比较。为了得到最大同源性，引入的缺失肽段用虚线表示。相同的残基用黑体字表示（据 Edelman, 1971）。

总之，从 IgG 免疫球蛋白分子的全部排列顺序得出的最有理论意义的结论是多肽链可以清楚地划分为具有不同的结构和功能的区域。抗体担任着两类主要的免疫学功能：识别抗原和对抗原或靶细胞产生特定的效应。这在抗体分子结构上的要求，既要适应于极其多种多样的结合专一性，同时又要保持某一类抗体相当稳定的结构来担任该类抗体特有的效应器功能。抗体分子就是借助于肽链结构的区域分化出色地完成了这种双重的任务：相配成对的 V_H 和 V_L 区域排列顺序的高度变异性适应于抗原结合专一性的多样性；同时 C_H 和 C_L 区域排列顺序的相对稳定又适应于担任特定的几种免疫学功能。抗体分子结构和功能的高度统一和完美性是亿万年进化过程中自然选择的结果。抗体分子的这种结构分化要求特别的遗传机制。

如上所述，重链的不变部分 C_H^1，C_H^2，C_H^3 和轻链的不变部分 C_L 的同源性表明它们在进化起源上是有联系的。鉴于 C_H 是由三个同源区构成的，因此假定抗体很可能是通过基因倍增（Gene duplication）过程而进化的。也就是假定重链和轻链的不变区可能起源于一个共同的"祖先分子"。这一个原始的基因，其大小能决定一个同源区的排列顺序，它自身增倍或增三倍，形成一个较大的基因来决定 C_H 的排列顺序。同时各同源区又可逐渐发生变异，造成重链类、型和功能的分化。另一方面，比较易变区（V_H，V_L）和四

段同源的不变部分（C_H^1，C_H^2，C_H^3 和 C_L），它们的长度大约相等，而排列顺序却极少相同。因此，设想易变区（V）和不变区（C）是由不同的基因（V 基因和 C 基因）控制的。在抗体分子进化的极早阶段，V，C 基因的构造上就发生异趋现象，以适应于分担识别抗原和发生效应的不同功能。事实上，根据遗传学分析，不变区（C）是受少数几个基因中的一个基因控制的，而在同一个体的易变区（V）是由另外许多基因中的一个基因控制的（Hood 和 Ein，1968；Milstein 和 Munro，1970）。换句话说，抗体的每条肽链（重链或轻链）是由两个基因共同来决定的。这在分子遗传学上是十分独特的现象，因为迄今已研究过的所有其他蛋白质分子，一个基因就能决定一条肽链。在一个体中，V 基因如何有许多变异形式，从而决定组成抗原结合位点的易变区的结构的多样性？V 基因（控制抗原结合位点的专一性）又如何与 C 基因（控制不变区的效应功能）连接起来，共同决定重链或轻链的结构？对于前一问题将在下面讨论抗原结合位点专一性时再提到。对于后一问题，目前假定是通过基因移位来实现的，我们将在以后的章节中再作讨论。

五、功能区和抗体的效应器功能

（一）功能区假说

从免疫球蛋白分子全部一级结构的考查得到的另一个重要理论成果是功能区假说（Domain hypothesis）（Edelman，1971）。抗体分子内，同源区的沿直线重复排列，易变区（V）和不变区（C）的每一同源区各有一个链内二硫环，以及链间二硫键集中于重链中段的狭小区域而将两个半分子连接起来。抗体分子内部的这种同源性和对称性提示各同源区的肽链可能靠链内二硫键的维系，折叠成一个个彼此类似的、致密的立体结构，并担负特定的免疫学功能，称为功能区。抗体分子的功能区结构可以用 IgG_1（Eu）的念珠模型清楚地表示（图 7-15）。分子假定呈"T"字形，由一串功能区相连而成。每一个功能区被一个链内二硫键维持结构的稳定，而相邻的功能区则由折叠程度低的肽链连接。因此，每一功能区各自能维持相对稳定的空间构象（这些假定后来已为抗体分子的 X 射线晶体学分析以及溶液构象的研究所证实，见下节）。Edelman（1971）还假定在抗体分子进化过程中，各功能区在结构和功能上发生分化，各自分担该类抗体特有的免疫学功能，如 IgG 的 V 功能区是结合抗原，C_H^2 是固定补体，如此等等。



图 7-15 IgG 之念珠模型，示功能区内链内二硫环的安排（据Edelman，1971）。

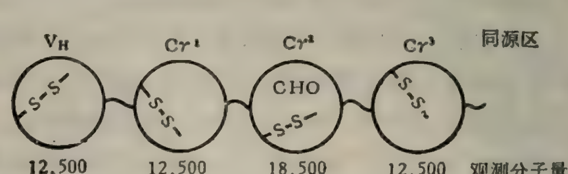


图 7-16 γ 链之功能区模型，CHO 示糖基团（据 Koch 等，1973）。

近来，用胰蛋白酶对 γ 重链进行可控制的酶解，使连接各功能区之间的三个键分别以不同速度断开，结果依次得到一系列分子量递减的含功能区的片段和全部功能区。除 C_γ^2 因含糖基团，分子量增加 6,000 外，其余三个功能区的分子量都相等，约为 12,500 (Koch 等，1973；Hellingwerf 等，1974）（图 7-16）。功能区和含功能区片段的制备成功，为研究抗体分子效应功能的结构基础准备了条件。

（二） IgG 效应器功能的定位

抗体的生物学功能要求同一分子专一地识别抗原，同时又保持各类抗体所特有的效应器功能。分子的这种功能分化是基础于结构的分化。按照功能区假说，这种识别功能和效应器功能假定是分别位于分子之 **Fab** 的易变区和 **Fc** 的不变区，而每一类抗体所特有的效应器功能，又假定分布在 **Fc** 的不同功能区上。已知 **IgG** 抗体具有固定补体（结合 C1q），致敏异种皮肤（PCA 反应），亲合细胞（与单核球、巨噬细胞、淋巴细胞等的 **Fc** 受体结合），以及穿过生物膜等功能。此外，抗原抗体复合物被淋巴滤泡阻留，也是依赖 **Fc** 和网状细胞的 **Fc** 受体结合。这些效应器功能在抗体分子上定位的问题是抗体结构和功能研究的另一个重要方面，目前还刚开始有初步的研究。

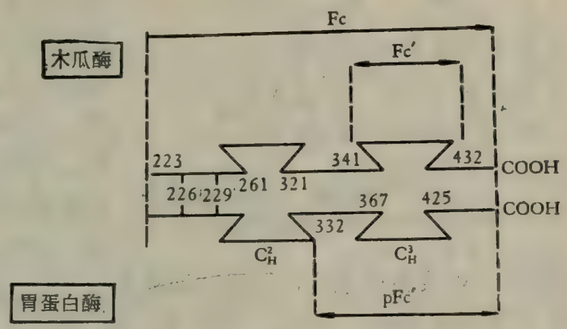


图 7-17 人 IgG_1 之 F_c 片段，含有 C_H^2，C_H^3 功能区，被木瓜酶和胃蛋白酶进一步切断成 F_c' 和 pF_c' 小片段。数字表示二硫键的位置（据 Cohn，1971）。

如前述（见194页），早期研究已证明 **IgG** 抗体固定补体的功能位于分子的 **Fc** 片段。同样地，还证明致敏异种皮肤（PCA 反应）、穿过胎盘等功能也是和 **Fc** 有关的（Ishizaka 等，1961）。不过，不同亚类的 **IgG** 则有所不同。如 IgG_2 的 **Fc** 能固定补体，而不能致敏皮肤。反之，IgG_4 的 **Fc** 能致敏异种皮肤，却不能固定补体（Ishizaka 等，1967）。由此可见，虽然和这两种功能有关的构造都位于 **Fc**，显然致敏异种皮肤和固定补体有关的构造是不同的。推而广之，其他几种和效应器功能有关的构造也可能是不同的，并可能分布在 **Fc** 的不同功能区上。这些效应器功能在 **Fc** 上的定位，可以用 **Fc** 的大小不同的酶解片段来作细致的分析。

人 IgG_1 的 **Fc** 断片（$C_H^2+C_H^3$）可被木瓜酶和胃蛋白酶进一步切成 F_c' 和 pF_c' 小片段（图 7-17）。F_c' 和 pF_c'（都只包含 C_H^3 功能区），仍然保持和巨噬细胞的亲合力，以及和某些类风湿因子的结合能力，但失去 **Fc** 原有的其他生物学活性（固定补体，致敏皮肤，穿过生物膜等）（Turner 等，1969；Natvig 等，1970）。另一方面，有证据表明固定补体（C1q）的功能位于 C_H^2 功能区（Okafor 等，1974）。近年来，利用分离的 C_γ^2 和 C_γ^3 片段进一步验证了抗体的几种效应器功能。当用经典的聚苯乙烯乳胶颗粒补体固定法（抗原吸附于乳胶颗粒表面）测定时，C_γ^2 片段只表现微弱的固定补体的活性（相当于完整 IgG 分子的约 3%）。然而，改用液相补体结合法测定时，就和完整的 IgG 分子或

Fc 片段有同样大小的活力。C_γ^3 在两种测定中都完全没有活力。由于 C_γ^2 片段只代表一个完整的功能区。这说明它能单独地和充分地表现结合补体的全部能力。同样地，还证明了 IgG 和豚鼠巨噬细胞的结合功能完全属于 C_γ^3 功能区。对放射性同位素标记的 IgG 及 Fab, Fc, C_γ^2, C_γ^3 等片段在血流中清除速度的测量表明，C_γ^2 清除的半衰期与 IgG 和 Fc 相同(约 70 小时)，而 C_γ^3 和 Fab 则快得多(约 15 小时)。以上这些实验清楚地证明 IgG 分子的至少有三种效应器功能是由 Fc 上的功能区各自独立地和充分地实现的 (Dorrington 和 Painter, 1974; Yasmeen 等, 1976)。

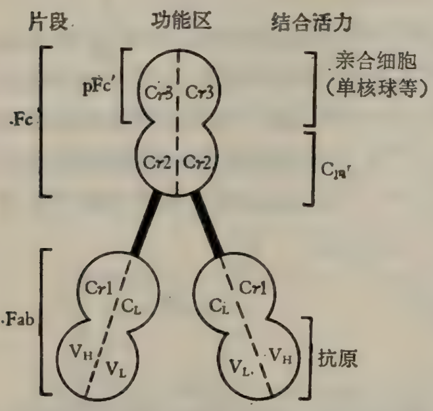


图 7-18 人 IgG 分子模式图，示不同功能区的结合活力 (Okafor 等, 1974)。

另一方面的研究也支持这一结论。小鼠分泌 IgG_1 的浆细胞瘤 (MOPC21) 的某些突变细胞系，所产生的 IgG_1 蛋白几乎完全缺少 C_H^1 或 C_H^3 功能区。这提供了研究效应器功能定位的好材料。近来，有人利用这些突变细胞系分泌的构造不同的 IgG_1 分子研究它们和小鼠淋巴细胞表面 Fc 受体的相互作用，发现 IF_2 突变细胞系分泌的 IgG_1 (缺少 C_H^1 功能区) 能抑制淋巴细胞聚集成玫瑰花簇 (Rosette formation)，而 IF_1 和 IF_3 分泌的 IgG_1 (缺少 C_H^3)，则没有这种抑制作用。因此，IgG_1 和淋巴细胞表面 Fc 受体的亲合可能通过 C_H^3 功能区，而和 C_H^1 无关 (Ramasamy 等, 1975)。此外，IgG 和人单核球，豚鼠巨噬细胞的 Fc 受体的亲合，以及和细胞毒性"K"细胞，中性球的 Fc 受体的亲合也都是和 C_H^3 功能区有关的。因此，IgG 的 C_H^3 功能区可能具有和免疫系统有关的许多种细胞的 Fc 受体亲合的特性。

综合以上这些结果，可以把 IgG 各功能区的已知的或推测可能有的生物学功能，列于表 7-3 (Dorrington 和 Painter, 1974) 和图 7-18。IgG 还有一些效应器功能的定位，如通过胎盘、致敏异种皮肤 (PCA)，目前还不太清楚。不过，新近有证据提示致敏异种皮肤的功能依赖完整的 Fc，而不是个别的功能区 (Ovary 等, 1976)。小鼠卵黄囊和胎盘细胞上均发现 Fc 受体 (Elson 等, 1975)。人胎盘细胞膜上也存在能和 IgG 专一结合的 Fc 受体。与这种 Fc 受体的结合同样需要完整的 Fc; 个别的功能区，C_γ^2 或 C_γ^3，均不能。对于每一功能区担任一种独立的生物学功能的假说说来，这些事实似乎是例外 (McNabb 等, 1976)。

研究抗体 Fc 的效应器功能，还可以采用化学改性的方法，即改变抗体分子的特定的氨基酸残基，如使赖氨酸酰胺化或氨基甲酰化，色氨酸苄化，能分别地改变 Fc 的各种功能，而不致影响抗体结合抗原的能力。例如，家兔抗卵白蛋白抗体经过这样处理后，固定补体、亲合巨噬细胞的能力都显著地降低，而致敏异种皮肤 (PCA) 的能力则不受影响 (Cohn 和 Thracher, 1973)。用 2-羟-5-硝基甲苯溴盐 (NBB) 改变家兔 IgG 及其 Fc 的酶解片段的色氨酸残基的实验，还提示 IgG 分子和 C1q 的结合位点，似乎是由 Fc 的不同部位的氨基酸残基共同组成的，而 Fc 结构的完整性是激活 C1 的先决条件 (Allan 和 Isliker, 1974)。另一种可能的解释是或许 C1q 结合位点确实位于 C_H^2 功能区上，

表 7-3 IgG 各功能区的生物学功能

功能区	已知或可能的功能
$V_H + V_L$	结合抗原
$C_H^1 + C_L$	抗原结合位点和效应器之间的"间隔物"
C_H^2	1. 固定补体 (C1q) 2. 控制降解代谢率
C_H^3	亲合细胞: 1. 巨噬细胞和单核球 2. 异种肥大细胞 3. 细胞毒性"K"细胞 4. 淋巴球 (B 细胞) 5. 中性球

(据 Dorrington 和 Painter, 1974)。

不过需要 Fc 各功能区之间的协同作用才能维持激活 C1 所需的构象。

IgG 抗体通过分子上的这些效应器(功能区)能够进一步激活机体的许多免疫学效应机制, 包括通过和 C1q 的结合而激活补体系统，通过和细胞表面 Fc 受体的亲合而激活巨噬细胞和中性球对细菌的吞噬作用以及细胞毒性"K"细胞对靶细胞的杀伤作用等,达到中和或处理抗原的防御目的。然而，抗体只有和抗原结合后，才能激活这些效应机制,天然的 IgG 分子并不能起这种作用。不过,在没有抗原存在的条件下,一些物理处理(加热、聚集等)也能模拟激活抗体的作用 (MacLennan 等, 1973)。这提示抗体和抗原结合时，分子的构象要发生某种变化(物理处理可能模拟这些变化)才能起这种作用。这种分子构象的变化可能涉及到各功能区之间的协同作用。

(三) 各功能区的协同作用

抗体的生物学功能要求同一个分子能专一地识别无数的抗原，同时还保持各类抗体所特有的几种效应器功能。免疫球蛋白分子的结构安排,各功能区的分工,可以理想地适应于这种功能上的要求。然而,要实现这些功能,抗体分子的不同功能区不但需要有"分工",而且还需要"协作"。如上所述,天然抗体分子单独不能固定补体,只有在和抗原结合后,或非专一地聚集后(加热或特别化学处理)才能固定补体。细胞亲合抗体也只有通过和抗原的相互作用,才能引起靶细胞释放组织胺等物质，而导致一系列速发型过敏反应。G. Edelman (1971) 首先用各功能区的协同作用来解释这些现象。他认为抗体分子象一个开关,当和抗原结合时,触发分子构象的变化而开动其效应器功能,如同酶分子和底物结合时,通过变构作用而开动其功能一样。他还进一步设想抗体分子的易变区 (V) 和抗原结合后,可能引起分子结构的重排,通过铰链区的转动而使原来被掩盖的补体结合位点(C_H^2)和其他效应器部位暴露出来,导致靶细胞的一系列反应(图 7-19)。至于抗体分子的变构作用的细节,不同作者还持有不同的看法,有待于进一步立体结构和溶液内构象变化的深入研究来解决。不过,无论如何分子一个部位的反应能影响另一个部位的功能活动的看法,则是一致的。这表明对抗体分子结构和功能的了解,不仅需要弄清楚免疫球蛋

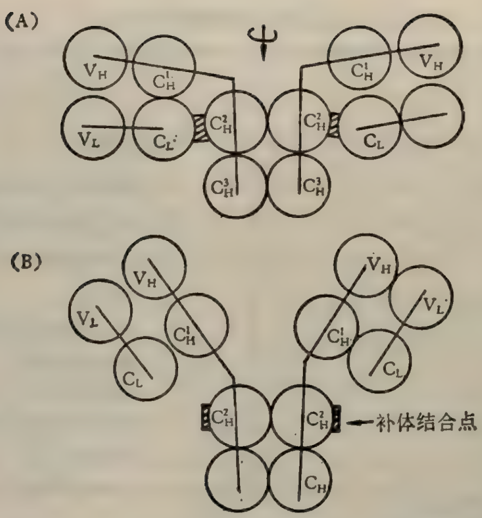


图 7-19　功能区假说 (Domain hypothesis)。 V_L, V_H = 易变同源区组成的功能区　C_L, C_H^1, C_H^2, C_H^3 = 不变同源区组成的功能区。 每一个功能区具有类似的空间结构，分担一定的免疫学功能。 V 功能区担任识别抗原功能，C 功能区担任发效器功能。 (A) 游离 Ig 分子中，功能区假定的排列。(B) 和抗原结合后的重排列，补体结合点外露。(据 Edelman, 1971)。

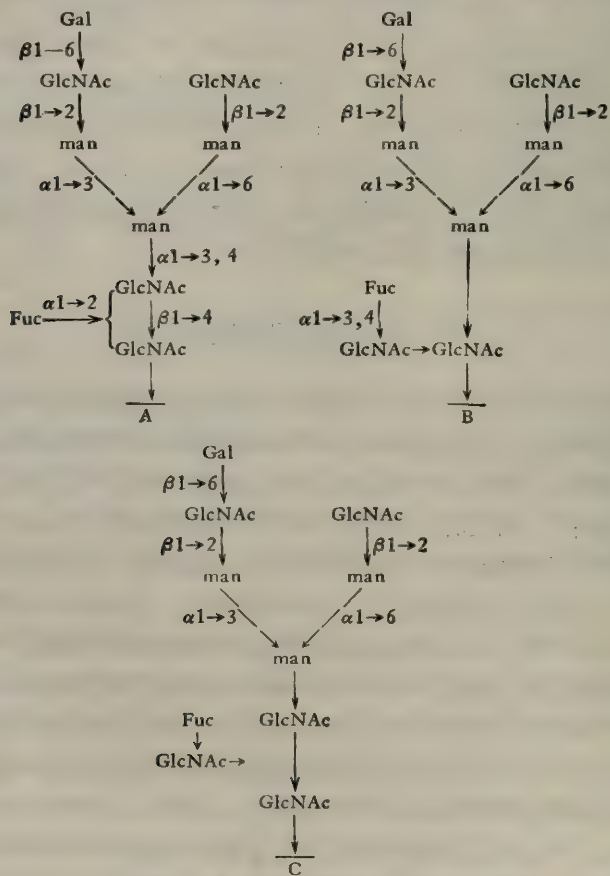


图 7-20　人 IgG 髓细胞瘤蛋白质低聚糖辅基的构造。其中两个髓细胞瘤蛋白质的辅基构造如 A 所示;两个如 B 所示;第 5 个如 C 所示(据 Kornfeld 等,1971)。

白的一级结构，而且尤其需要用物理学方法研究分子的立体结构和溶液内构象，以及分子各部分相互影响时构象的变化。

(四) 糖多肽的构造和效应器功能

IgG 是一个糖蛋白，每一个分子可能含有一个或一个以上的低聚糖基团，其化学构造和功能还不太清楚。

人类 IgG_1 含有一个低聚糖基团，位于分子的 Fc 片段上。某些 IgG 髓细胞瘤蛋白质还发现另一个低聚糖基团，位于 Fab 片段上。Kornfeld 等 (1971) 研究了七种 IgG 髓细胞瘤蛋白质的糖多肽，发现存在几种类型的构造(图 7-20)。甚至同一个均一的髓细胞瘤蛋白质的低聚糖分枝的末端基团，也可能有微小的差异。这种细微的不均一性可能是在低聚糖合成过程的晚期发生的，或已经合成好的糖基团在血流中再被部分酶解的结果。此外，还观察到某些病人糖多肽构造的核心部分也有差异，原因和意义都还不清楚。

人类 $\gamma 1$ 重链的一个低聚糖基团是和 297 位置的门冬酰胺连接的，即位于 C_γ^2 功能区的中部。家兔 γ 链在相应的位置同样也有一个低聚糖基团存在 (Hill 等，1966)。根据所在位置推测，其功能可能和结合补体有关系。IgG 的低聚糖基团和其他效应器功能，特别是细胞亲合功能有无关系，是值得注意的问题。

六、IgG 分子的形态和立体结构

在 X 射线晶体分析和电子显微镜技术达到目前水平以前，对抗体分子形状的早期研究是用液体动力学方法(超离心沉降、扩散和粘度测定)进行的。

(一) 液体动力学研究

早期研究提示 IgG 分子是不对称的 (轴比≒6:1)，或者处于高度水合状态 (参看 Dorrington 和 Tanford，1970)。IgG 分子的不对称形状，得到初期的电子显微镜观察的支持。一段时期内，曾经认为 IgG 是坚硬的棒形分子 (Edelman 和 Galley，1964)(图 7-21b)。然而，Noelken 等 (1965) 对 IgG 分子的高内禀粘度和摩擦系数作了另外的解释。他们观察到 IgG 分子的摩擦系数高达 1.47，比一个典型的球蛋白质的值 (1.1—

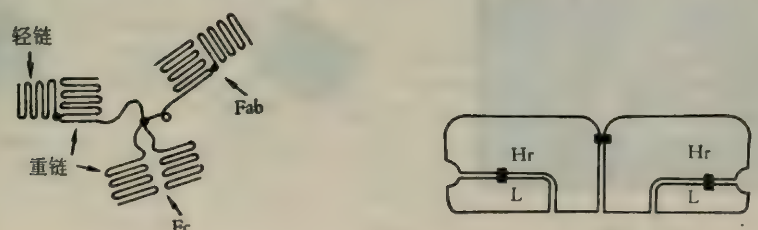


图 7-21 IgG 分子的分节柔曲模型 (Noelkern 等，1965) (a) 和硬棒状模型 (Edelman 和 Galley，1964) (b) 的比较。粗短黑线代表链间二硫键(据 Dorrington 和 Tanford，1970)。

1.3) 要高；而 Fab，Fc 片段却表现正常的内禀粘度和摩擦系数。因而推想这些坚实的片段可能联结成“Y”字形，连接处(“铰链区”)有相当的柔曲性，并处于高度水合状态(图 7-21a)。这就可以解释高的摩擦系数和连结区易于受酶解。

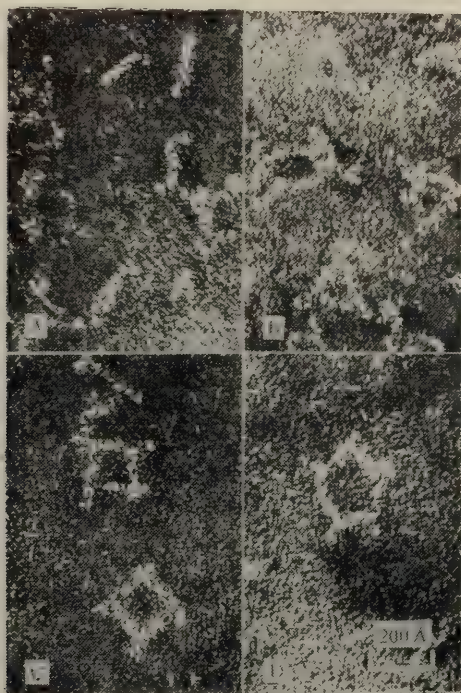


图 7-22　家兔抗-DNP IgG 和双价 DNP 半抗原混合时形成的各种 IgG 多聚体。(A) 二聚体。(B) 三聚体。(C) 四聚体。(D) 五聚体。环形多聚体的角上可看见突起(×800,000)(据 Valentine, 1967)。

(二) 电子显微镜观察

电子显微镜观察对抗体分子形状提供了不少有价值的知识。游离的抗体不能得到清楚的图象，提示分子可能是松动的，没有固定形状。抗体和多价抗原或半抗原结合后就可以得到清楚的图象。通常用双价半抗原 (Bis-dinitrophenyl (DNP)-octa-methyldiamine) 和家兔高亲合力的DNP-抗体结合后，经磷钨酸钠或硅钨酸盐反染色，抗体分子便在薄层重金属盐的深色背景上呈现出电子密度低的清楚的印迹 (Valentine 和 Green, 1967; Green, 1969)。3—5 个抗体分子经双价半抗原分子相连成为多角形环，转角处有突出物。偶尔也可见到“Y”字形的单体或两“Y”相连的双体(图 7-22)。如用胃蛋白酶消化后，只剩下多角形环，而没有突出的棒(图 7-23b)。因此，突出的棒应为 Fc，而多角形环应为几个“Y”字形的 IgG 分子的两臂 $F(ab')_2$ 经双价半抗原相连而成。

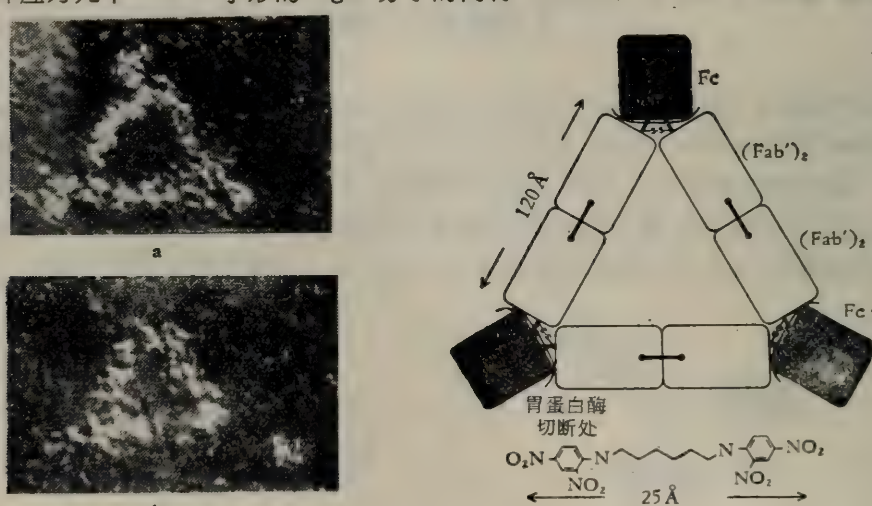


图 7-23　电子显微镜观察胃蛋白酶对半抗原抗体复合物的影响。(a) 酶处理前。(b) 酶处理切去 F_c 后，角上的棒状物消失。(c) 据抗体-半抗原复合物电子显微镜图形重绘的示意图。三个双价半抗原分子把 3 个 IgG 分子连接成三角形(据 Porter, 1967)。

$F(ab')_2$ 两臂间的夹角可能变动在110°—180° 之间。这表明 Fab' 臂以"铰链区"为轴心可作相当大幅度的转动。多角形环每边的长度为 120 Å，相当于两倍 Fab' 臂的距离，因此 Fab' 臂长约为 60 Å。Fc 长度约为 50 Å(图 7-23c)。

(三) X射线晶体分析

蛋白质分子的全部立体结构，包括多肽链的空间排布和链上的氨基酸排列，目前只能用 X 射线晶体分析法得到。然而，这种在血红蛋白、溶菌酶等结晶蛋白质上行之有效的方法，在抗体研究上却遇到很大的困难。首先是由于抗体分子的高度不均一性，不能形成结晶。即使改用均一的髓细胞瘤蛋白质，也很难得到稳定的结晶以供高分辨率的 X 射线衍射分析。

1. IgG_1 (Dob) 的 6 Å 分辨率的立体结构模型

直到 1971 年才有人报告一种人 IgG_1 髓细胞瘤蛋白质 (Dob) 的低分辨率(6 Å)的立体结构模型，以及对同一晶体的电子显微镜观察结果(图 7-24；图 7-25)。这种蛋白质属于冷性结晶球蛋白 (Cryoglobulin)，在 4°C 时能自行从血清或血浆中结晶出来。纯化和重结晶后，得到的晶体形态为单斜棱晶，平均大小为 0.5 毫米。此晶体对 X 射线敏感，易被破坏，因此不能得到高分辨率的衍射图形。根据衍射图形重组的分子立体模型(筏木模型)呈"T"字形(图 7-24)。"T"形分子有三个球状区，两翼相当于 Fab，另一为 Fc。Fab 和 Fc 之间由相当于"铰链区"的细带相连结。这可以解释"铰链区"的柔曲性和易被酶解。Fab 和 Fc 的大小同从其他方面得到的结果的比较，列于表 7-4。由于分辨率低只能看出分子大体的轮廓，不能追踪多肽链盘曲的走向，抗原结合位点的精细结构等最重要的问题还不能得到解决。这方面的改进办法，除了继续寻找新的更稳定的免疫球蛋白晶体之外，还可以先用比较稳定的免疫球蛋白片段的晶体作分析，然后再拼凑成整个分子的模型。



图 7-24　人 IgG_1 髓细胞瘤蛋白 (Dob) 根据 6 Å 分辨率的 Fourier 图用筏木做的模型。垂直部分相当于分子的 F_c，两翼状部分相当于 Fab。标尺代表 30 Å (据 Davies 等，1971)。

表 7-4　Fab 和 Fc 的大小用不同方法得到的结果

	本　工　作	电子显微镜观察	低角度 X-射线散射
Fab	70×50×40 Å	60×35 Å(1) 60×30 Å(2)	98×42×42 Å(3)
Fc	85×45×38 Å	45×40 Å(1) 50×35 Å(2)	99×47×47 Å(3)

(1) Valentine & Green (1967);　(2) Labraw & Davies (1971)　(3) Pilz 等(1970)。

2. Fab′ New 的低分辨率的立体结构模型

由于 Fab 和 Fab′ 含有轻链和重链的易变区和原抗体分子的抗原结合位点，所以有极大的理论兴趣。有人报告了人免疫球蛋白 Fab′ New 片段的分辨率为 6 Å 的晶体构造（Poljak 等，1972）。Fab′ New 是从一种人髓细胞瘤蛋白质 IgG_1 New（λ, Gm(1, +3, −4, −5)）制备并结晶的。从 X 射线衍射图形重组的 Fab′ 立体模型(图 7-26)看来，最显著的特点是存在大小近似（30 × 40 × 50 Å）的两个致密的球形“结构亚基”。两个球相连而成的 Fab′ 的大小为 40 × 50 × 80 Å，这和上述表 7-4 的结果是一致的。从图 7-26 可追溯两条清楚的链（或许相当于 L 链和 Fd′ 链）从一个球延伸人第二个球。它们似乎从 Fab′ 一端的 V 结构亚基开始，先经过短而直的一段，然后复杂地盘曲成球形(包括一个环)，再从球中延伸出来，经一段直线再进入第二个球（C 结构亚基）。由上述推测：第一个球状结构亚基 $V = (V_L + V_H)$，第二个球状结构亚基 $C = (C_L + C_H^1)$。在 V 结构亚基开始处，两条链共同形成一个空穴，其大小相当于抗原结合位点的大小。

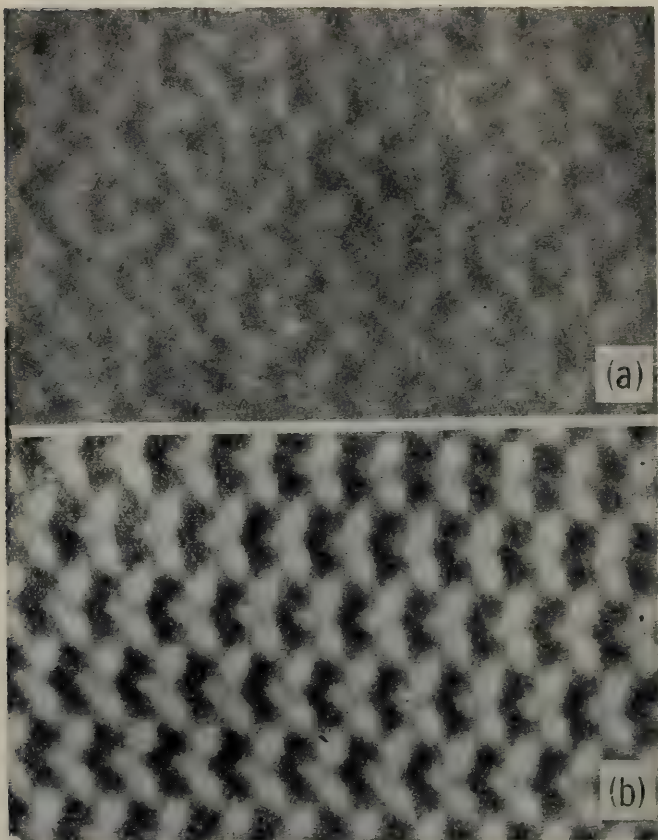


图 7-25 人 IgG_1 (Dob) 晶体薄切片的电子显微镜照片。(a) 原照片经“光学平均”技术处理后的图象。(b) 图为 (a) 再经过第二次光学平均技术处理后得到的图象(据 Labraw 和 Davies, 1971)。

如前述，Edelman 的功能区假说主张 L 和 H 链的每一同源区（约 110 氨基酸残基）靠一个链内二硫键维系，折叠成一个致密的三级结构(功能区)，相邻的功能区由较短而不折叠的一段肽链相连结。上述 Fab′ New 立体模型和这一假说是很符合的。

表 7-5 各结构亚基组成

结构亚基	重链和轻链的同源区	片段
V	V_L, V_H	Fab′ 或 Fab
C_1	C_L, C_H^1	
C_2	$(C_H^2)2$	Fc
C_3	$(C_H^3)2$	

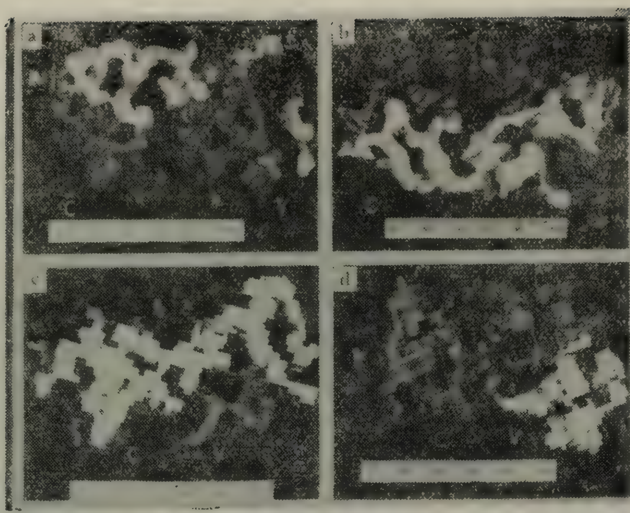


图 7-26 Fab′ New 6 Å 分辨率模型的照片。模型的深色和浅色部分代表两条连续的肽链。V，C 示两个球形亚基。照片右侧的箭头指 V 亚基内的空穴，相当于结合位点。(a) 模型"顶面"观。虚线指示 V 和 C 亚基之间相连部分。(b) 模型"底面"观。(c) 模型"侧面"观。两个结构亚基清楚可见。(d) 模型另一侧(据 Poljak 等,1972)。

总之，根据这一假说，Fab′ New 立体模型的特点是存在两个球状结构亚基（V，C），而每一个结构亚基又是由两个功能区构成的。从以上结果推想，IgG 分子的全部立体结构的轮廓可用简图表示(图 7-27)。其中各结构亚基组成见表 7-5。

3. Fab′New 的高分辨率立体结构模型

后来，Poljak 等 (1973) 发表了 Fab′ New (IgG_1) 的 2.8 Å 分辨率的立体结构。在根据高分辨率电子密度 Fourier 图制作的立体结构模型上（图 7-28)，除去分子轮廓和亚基排列与 6 Å 分辨率的结果相同外，还能进一步追溯多肽链在亚基内盘曲的走向，链上氨基酸残基排列顺序，以及在许多情形下区别其侧链。如可预料到的，分子内部是由密集排列的疏水性侧链构成的，几个酪氨酸酚环上的氧原子和天门冬氨酸侧链之间形成氢键。分子内部没有 α-螺旋构象。各功能区 (V_L，V_H，C_L，C_H^1) 内部，伸展的多肽链沿着和功能区长轴平行的方向往返转折，紧凑地排布，形成一个牢固的骨架 (β-构象)，多肽链之间靠氢键维持稳定。这些观察证实了将在下面讲到的溶液内圆二色谱实验的结果 (Ghose 和 Jirgersons, 1971)。此外，还能确定链间和链内二硫键和个别氨基酸在立体结构上的恒定位置。从这些分子结构细节的研究，可得出以下几点重要的结论：

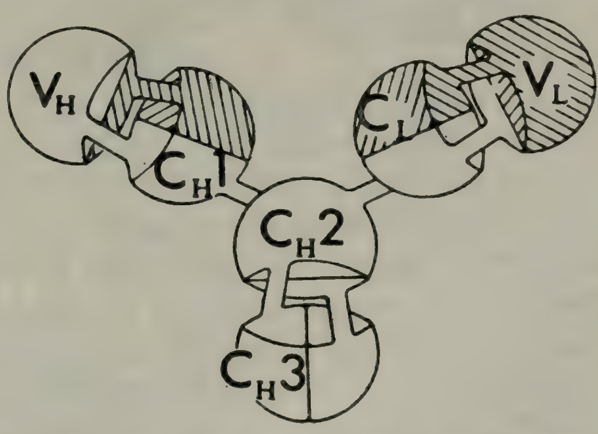


图 7-27 从 Fab′ 片段的构造和对称，推测 γG 分子的立体结构。这里只表示出 Fc 和 Fab′ 的一种可能的相对安排 (据 Poljak 等,1972)。

(1) 功能区空间构象的相似性

相当于 H，L 链同源区的四个功能区（V_L，V_H，C_L，C_H^1）不但外形和大小（40×25×25 Å）相似，内部多肽链盘曲的样式也很相似。这是和这些功能区一级结构的同源性以及免疫球蛋白在进化上起源于基因倍增的假说相符合的。各同源区一级结构的相似性决定其空间构象的相似性。属于易变区的两个功能区（V_L 和 V_H）与属于不变区的两个功能区（C_L，C_H^1）是同源的（一级结构按最大同源性原则排列是相似的），因而其立体构象是大体上相似的，但是 V_H 功能区的一级结构按最大同源性原则排列时，还多出一段多余的肽段，在立体结构上也就多一段环形的肽段（图 7-29）。V_L 功能区和 V_H 功能区比较，缺少位于多余肽段处的 7 个氨基酸（54—60 位置），因而多余的环形肽段就变短了。于是，V_L 构象和C_L，C_H^1 的相似程度，应比 V_H 和 C_L，C_H^1 的相似程度高。

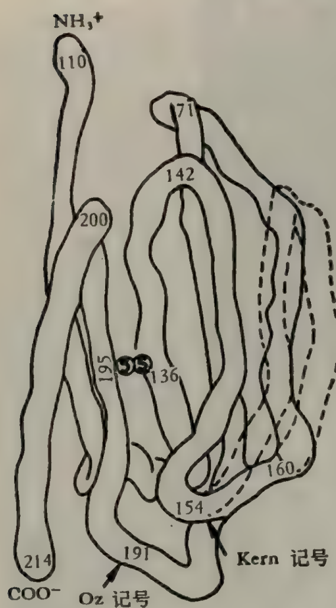


图 7-29 "免疫球蛋白折叠"的基本图型。实线表示不变区功能区（C_L，C_H^1）多肽链的折叠形式。数字指示 L(λ) 链，从 NH_3^+ 端起始（相当于L链的 110 残基位置）的残基位置。虚线表示 V_L，V_H 功能区特有的附加的环形肽链（据 Poljak 等，1973）。

(2) 二硫键的位置

所有免疫球蛋白，链间二硫桥的半胱氨酸在轻链上一般都位于 C 末端。至于在重链上则可能有两个不同的位置。人类 γ1 重链（IgG_1），链间二硫桥的半胱氨酸残基位于 214位置处，靠近 Fd′ 的 C 末端。另一些重链，如人类 γ2、γ3、γ4 链和 μ 链，家兔 γ 链，小鼠的 γ2a、γ2b 链以及豚鼠的 γ2a 链，相应的半胱氨酸残基却位于 131 位置附近。这种差别过去很难解释。在 Fab′ New 立体模型上，这三个位置（一个在 L 链，两个在 H 链）在空间上都靠得很近（相距约 6 Å），这就使得链间二硫桥在重链上改换为另一种连接位置[214 (L)—131 (H)] 时，不致改变肽链总的折叠样式。又如，人类 γ1 链（Daw）的V_H 区的不常见的链内二硫桥（35—101 位置），以及家兔专一的抗多糖抗体 3315 的 L 链（κ）的不常见的二硫桥[80(V_L)，171(C_L)位置]，当换成在Fab′ New 立体模型上的位置时，也都处于相距很近的空间位置（约 6 Å 或约 5.5 Å）。总之，Fab′ New 立体模型提供了一个适当的构造骨架，可以圆满地解释根据一级结构分析得到的各种链间和链内二硫桥位置的不常见的变化，因为这些位置在立体模型上都处于彼此很靠近（约 6 Å），易于形成二硫桥的空间位置。

根据这些观察以及 Fab′ 各同源区空间构象的相似性，可以得出一个重要的假说：由于同源区一级结构的相似性决定其空间构象的相似性，各种 κ 或 λ 型轻链的 V_L，C_L 同源区应具有一个相似的总空间构象。同理，各类重链（α，γ，μ 等）的 V_H、C_H 同源区也应具有相似的总空间构象。不同类、型的 H，L 链的各同源区，各按最大同源性原则排列时，缺失或多余的肽段将只造成空间构象细节上的变化，而不影响它们的总空间构象的相似性。正由于各同源区的总空间构象在进化过程中能保持相对稳定性，整个抗体分子也

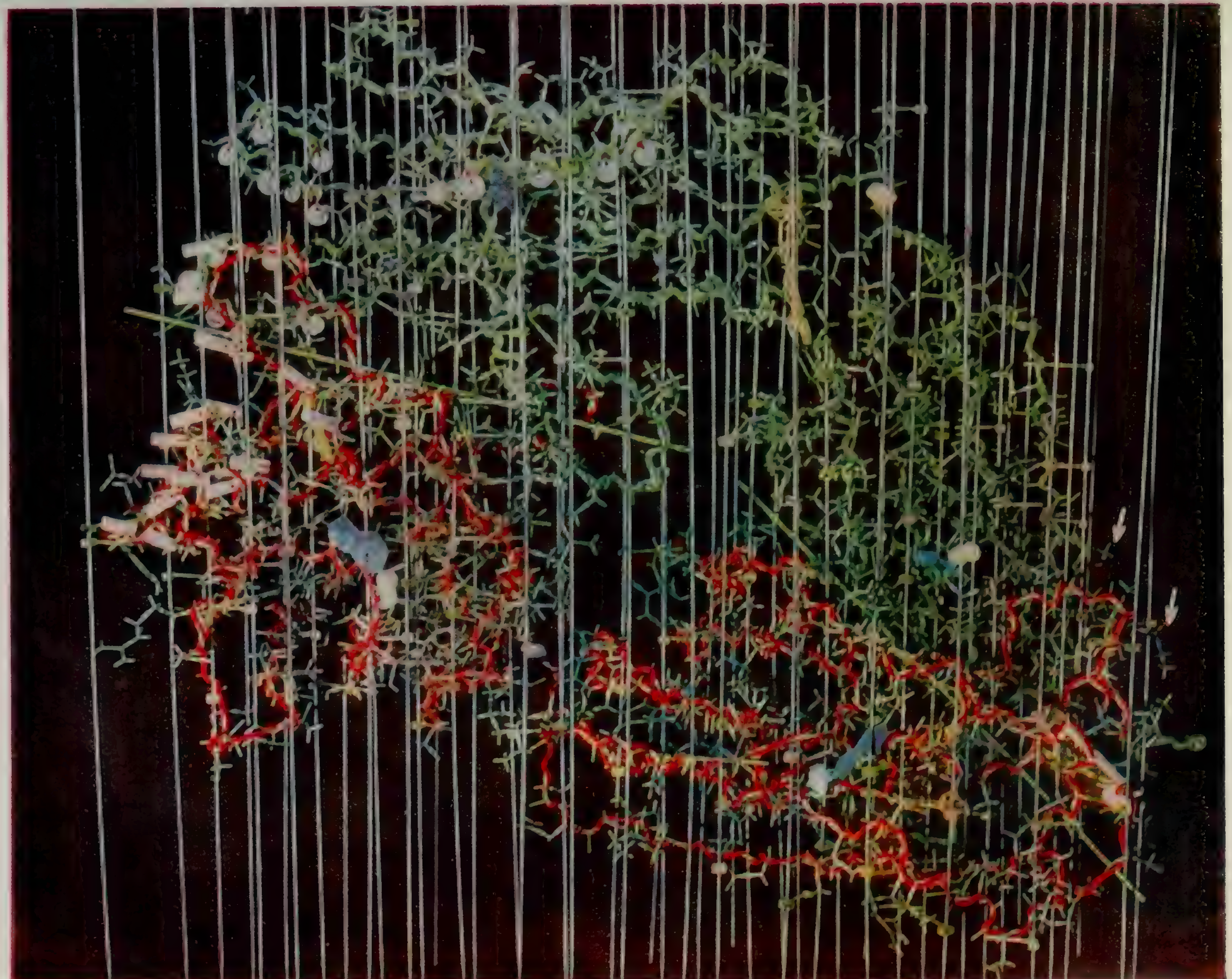


图7-28　Fab'New的2.8Å分辨率结构模型。L和Fd'(H)的多肽链骨架，分别用绿色和红色表示。V(左)和C(右)功能区被中央一条沟分隔。两条链中点的标签示“转折区”(Switch region)。两条黄线指示局部的两侧对称轴。4个链内二硫键和链间二硫键用白球表示。模型左端标签上的数字指示高变异区残基的位置。蓝色多角形表示每一亚基内，链内二硫键附近恒定的色氨酸的位置。模型右端的箭头指示Ser 154 (Kern记号)和Lys 191 (Oz 记号) (据 Poljak 等,1973)。

才能保持结构和功能的统一性。

(3) 非等位基因控制的专一抗原记号的位置

轻链 C_L 同源区上，Ser 154 和 Lys 191 相当于人类 λ 型轻链非等位基因决定的专一抗原记号 $Kern^-$ 和 Oz^+，这两个残基均位于分子的外侧表面，彼此相距很近，约 8 Å（图 7-29 箭头所示），很可能也就是由于这种外露的空间位置，它们才成为优势抗原决定簇。

(4) 高变异区和抗原结合位点

L，H 链排列顺序的高变异区位于 Fab New 分子的 N 端，镶嵌在 V_L，V_H 功能区之恒定的构造骨架上，它们的侧链完全暴露到溶液中（图 7-28）。位于此区域的抗原结合位点，只是一条由重链和轻链共同组成的浅沟（长宽 15×6 Å，深 6 Å），而不是像低分辨率模型上呈空穴状。从整个 $F(ab')_2$ 或 IgG 分子的外形和结构亚基的排列看来，Fab′ 的一些区域，从分子外部是难于接近的，因而可能是较弱的抗原决定簇；而高变异顺序区域的侧链则外露在分子一端的表面，例如轻链上 29、51、92、93 位置的氨基酸残基的侧链，至少象 Kern (gly/Ser) 和 Oz (lys/Arg) 基因记号一样显露在分子表面，因而可能构成优势抗原决定簇。根据这一结构模型，可以设想高变异区重链和轻链排列顺序的变化是个体型抗原专一性的结构基础，易于被抗个体型抗体识别。此外，专一半抗原和结合位点结合时，不致被深埋到这一条浅沟内，因而一般地也就会阻碍抗个体型抗体对结合位点的免疫优势基团的识别。同理，高变异区重链和轻链排列顺序的变化，也同样是抗原结合位点专一性的构造基础。关于这一问题，将留待抗原结合位点的结构一章再讨论。

(四) 溶液内构象的研究

由于抗体分子在溶液中的构象可能比晶体中的更接近天然状态，因此溶液中分子构象的研究特别重要。虽然至今这方面的研究方法还不够完善，不过已经提供了不少重要的知识。

1. 分子形状

自从根据液体动力学研究提出 IgG 分子的硬棒状模型（Edelman 和 Galley，1964）和分节柔曲模型（Noelken 等，1965）以来（图 7-21），IgG 分子在溶液中的天然形状，有过长期的争论。利用萤光偏振法进行的早期工作，未能得到肯定的结论。后来，改用毫微秒（nsec）范围内短脉冲偏振光激发，直接测量萤光发射各向异性（Emission anisotropy）的时程，始获得更为明确的结果。Wahl（1969）用 DNS-IgG（发色团 DNS 和蛋白质共价结合）进行研究，发现存在两个弛豫时间（Relaxation time）。一个弛豫时间为 370 毫微秒，是由于整个分子的转动，而另一个短得多的弛豫时间为 23 毫微秒，是由于分子内的勃郎运动，包括分子的一个球状区的转动（不过此弛豫时间太短，不足以代表象 Fab 那样大小的球状区）。据此作者认为天然 IgG 分子应有一定的柔曲性。

另一些作者采用同样的方法，不过 DNS 发色团是作为一个半抗原和抗 DNS 抗体（IgG）结合，而不是共价结合。他们同样观测到两个弛豫时间：一个为 500 毫微秒，和 Wahl 观测到的长弛豫时间相近；另一个为 100 毫微秒，相当于 Wahl 的短弛豫时间的四倍。但是，当 DNS 半抗原和抗体的 Fab 片段结合时，就只观测到一个弛豫时间，100 毫微秒。据计算这一数值正好相当于 Fab 大小的一个硬椭圆球体转动时所测到的数值。这些事实，以及用 $F(ab')_2$ 得到的结果，都支持天然 IgG 分子的分节柔曲模型，而不支持硬棒状模型（Yguerabide 等，1970）。此外，家兔抗 DNP-抗体（IgG）分子在电场中作定向排列，荷电半抗原和抗体的抗原结合位点结合时，引起分子内电荷分布变化可以从瞬时电双折射（Transient electric birefringence）测量反映出来。根据这种测量结果可以推测结合位点在抗体分子上的位置，并提示 IgG 分子在溶液内可能呈“Y”字形（Cathou 和 O'Konski，1970）。总之，所有这些实验都支持 IgG 在溶液中的分子形状符合由三个结实的球形区组成的分节柔曲模型。至于连接区的性质，和两臂间夹角的大小，则还有争论。

Pilz 等（1970）根据低角度 X 射线散射的研究，认为溶液中游离的 IgG 分子最可能的形状是“T”字形。这和上述 X 射线晶体模型的形状是一致的。抗体分子只有和抗原结合后，Fab 两臂才有更尖的夹角，而改变成“Y”字形。此外，还发现半抗原能诱导抗体分子的体积缩小，但对 Fab 片段则无影响。这也提示半抗原和抗体相互作用时，抗体分子的构象可能发生变化（Pilz 等，1973；1975）。Edelman 根据这些材料，主张抗体和抗原结合后，分子变形，抗体分子的两臂从“张开”状态改变为“合拢”状态，于是位于 C_H^2 功能区的补体结合位点便暴露出来，导致一系列的效应器反应的激活。然而，R. R. Porter 实验室却注意到，IgG 分子的二聚物和三聚物与半抗原连接后，不能固定补体，必须是更高的聚集物才有效。电子显微镜观察发现有效的和无效的聚集物之间，唯一可见的区别是 Fab 两臂间的夹角的大小。无效的聚集物中抗体分子的夹角 <60°，有效的则为 90—180°。因此，推想原来呈“Y”字形的 IgG 分子在和抗原结合后，两臂“张开”，引起 Fc 的构象变化，因而激活固定补体的部位（Hyslop 等，1970）。这两个实验室的看法显然是矛盾的。

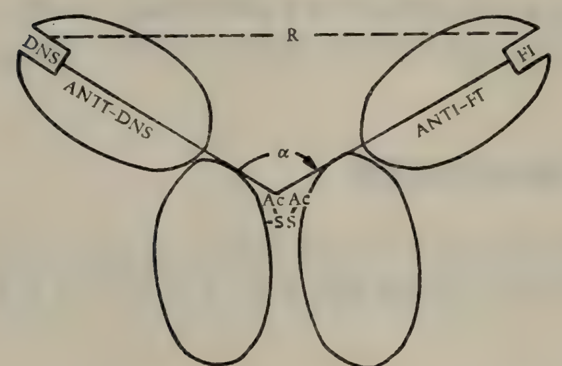


图 7-30 抗 DNS-抗萤光素（ANT-FI）杂种分子-半抗原复合物的简图。(R) 半抗原结合位点之间的距离；(α) Fab 之间的夹角 (A_c)；羧次甲基基团(据 Werner 等，1972)。

Werner 等（1972）利用单个光量子的能量传递，测量抗体两结合位点之间的最小距离的方法，研究了家兔 IgG 分子在溶液内的形状。为此，他们制备了一个结合位点的专一性针对能量供体（DNS），另一结合位点则针对能量受体（萤光素，FI）的“杂种”分子抗体（图 7-30）。在这种“杂种”抗体分子上，并不能观测到与抗体结合的这两个基团之间有能量传递。已知在这两基团之间能量传递的最大有效距离不能超过 82 Å。由此推测，溶液内 IgG 分子两结合位点之间的平均距离，至少应达到 92—100 Å。假定Fab长度为

70Å，则两 Fab 臂间相应的最小夹角（α）就应为80—95°，而不应小于80°。也就是说，IgG 分子在溶液内的形状比较接近“T”字形，而不是“Y”字形。这提示电子显微镜下，观察到的抗原抗体复合物的形状，或许不能能代表抗体未和抗原结合时的天然构象。电子显微镜中所观察到的形状，很可能是由于在标本制作过程中脱水而造成的。总之，尽管对溶液中天然抗体分子的形状以及在和抗原结合后分子形状变化的细节还存在不同的看法，分子一个部位的反应能影响另一个部位的反应的现象，无论如何是十分重要的，需要进一步深入探讨的。顺便提及，动力学分析对这一问题也可以提供有价值的材料。对 IgA（MOPC 460）均一抗体在和三种不同的半抗原结合达到平衡时所作的动力学分析，发现存在两个明显不同的弛豫时间。这提示同一种抗体分子，当以不同的结合常数和半抗原结合时，可能处于两个可互相转化的构象；抗体的结合位点和半抗原结合时可能触发分子构象的转变（Lancet 和 Pechet，1976）。此外，单价抗原和半抗原对 IgM 抗体的亲合力也有不同。单价抗原的亲合常数（Ka）比较小，这提示一部分结合能量可能被用来激活 Fc 的补体结合位点（Brown 和 Kosland，1975）。

2. 功能区内的构象

目前溶液内蛋白质分子构象的主要研究方法有旋光色散（Optical rotatory dispersion，ORD）和圆二色谱（Circular dichroism，CD）等。根据 ORD 和 CD 光谱特性可以判断天然蛋白质分子内，α-螺旋构象和 β-构象的含量。对 IgG 分子及其片段，用 ORD 和 CD 法研究的主要结果是分子内不存在任何 α-螺旋构造。CD 光谱的另一个特征是217mμ 的圆二色谱有最小值，提示分子内部可能存在靠氢键维系的平行排列的多肽链，即 β-构象（图7-31）（Cathou 等，1970；1974）。如前213页提过的，用高分辨率 X 射线晶体分析得到的 Fab′ New（IgG_1）的立体结构模型也证实了这些结果。

对人 IgG 髓细胞瘤蛋白质及其酶解片段的旋光色散谱（ORD）的分析发现，Fab

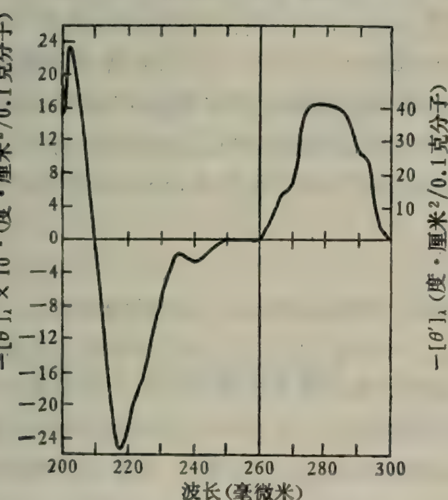


图7-31 人 IgG 髓细胞瘤蛋白之圆二色谱。192，217 和 240 毫微米处有负谱带；202 和 232 毫微米，以及 260—300 毫微米区域有正谱带（据 Cathou 等，1968）。

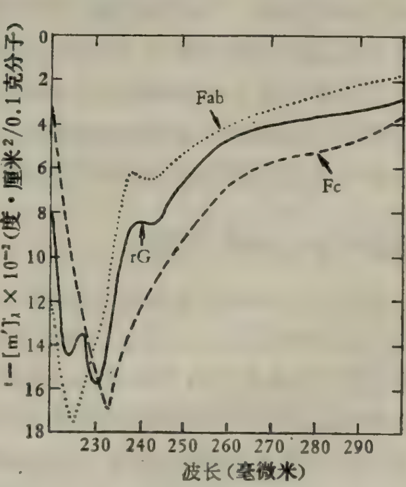


图7-32 人 IgG 髓细胞瘤蛋白质及其酶解片段 Fab 和 Fc 之旋光色散谱。IgG 光谱之 225 和 240 毫微米 Cotton 效应最小值是由于 Fab，而 230—232 毫微米最小值是由于 Fc（据 Dorrington 和 Tanford，1970）。

和 Fc 两片段的光谱之和等于整个分子的光谱。这提示各片段的构象有相当的独立性，在酶解过程中大体上没有变化（Dorrington 和 Tanford，1968）（图7-32）。用圆二色谱法，对K型轻链的研究也同样发现分离的易变区（V_κ）和不变区（C_κ）的 CD 光谱之和等于整个轻链分子的 CD 光谱（Ghose 和 Jirgensons，1971）。这些事实说明，天然状态下 IgG 分子内部各片段和功能区能保持相当独立和稳定的构象。然而，最近用圆二色谱对 Fc 及其分离的功能区（C_γ^2，C_γ^3）间的构象关系作进一步分析的结果，发现 Fc 之光谱并不完全等于组成它的分离的功能区的光谱之和。这提示 Fc 内也可能存在一定程度的功能区之间的相互作用（Ellerson 等，1976）。总之，这些事实似乎说明天然状态下，IgG 分子内部各功能区能保持相当独立而稳定的构象，同时通过功能区间的相互作用又可能发生一定程度的改变。由于功能区结构上的这种稳定性和可变性，整个抗体分子才能在保持各功能区的结构完整性的条件下，又能对结合抗原作出种种效应器反应。

（五）抗体分子的“变构作用”和效应器功能的激活

抗体分子只有和抗原结合后，固定补体的效应器功能才被激活。关于抗体 Fc 的效应器功能激活的机制，目前主要存在两种不同的假说：1）“变形”机制（“Distortion” mechanism）。抗原和抗体的结合位点结合时，引起 Fab 和 Fc 的相对移动和两者之间夹角的改变。这种分子形状的变化，使 C_H^2 功能区暴露出来并导致结合补体功能的激活。这在前一节已讨论过，不再赘述。2）“变构”机制（“Allosteric” mechanism）。抗原和位于 Fab 的抗原结合位点结合时，引起构象变化并传递到 Fc，触发效应器功能的激活。前一节中已提到过的，抗原抗体反应的动力学分析，以及利用小角度 X 射线散射法测量抗体体积的变化等结果，均支持这一假说。

抗原和抗体相互作用中，抗体的构象变化与其效应器功能激活的关系是抗体结构和功能的研究中的一个基本问题。对于这一重要问题，从七十年代初期以来，虽有人试图用测量沉降速度的微细变化（Werner 和 Schumaker，1970）、圆二色谱（Cathou 等，1970）、重氢交换（Ashman 等，1971）以及对酶解的易感性变化等方法来研究抗原抗体反应过程中抗体分子溶液构象的变化，但是均未得到明确的结果。直到最近几年，由于圆偏振激发光谱的应用和免疫球蛋白 X 射线晶体分析方面的新发现，始取得重要的进展。

1. 圆偏振激发光谱（CPL）

最近有人利用圆偏振激发光谱（Circular Polarization Luminescence，简称 CPL）来研究抗体和抗原结合时的构象变化。一个蛋白质分子内的不对称发色团（如色氨酸残基）之激发光波能部分地圆偏振化。这种圆偏振激发光谱（CPL）能反映分子的不对称性，因而可作为分析蛋白质构象变化的灵敏工具。免疫球蛋白的各功能区，在相对应的空间位置正好都有 2—3 个色氨酸残基存在，特别适合于 CPL 光谱分析（图7-33）。根据对几种抗体（抗 RNase、抗磷酸胆碱抗体等）和抗原结合时 CPL 光谱分析的结果，发现抗体的 Fab 和抗原结合时，Fab和Fc 内色氨酸残基的不对称性都发生改变（图7-34）。这说明位于抗体之 Fab 上的抗原结合位点和抗原结合时引起该部位发生构象变化，这种变化还可能从 Fab 传递到 Fc（Givol 等，1974）。

利用这一方法作进一步研究还发现，抗原和Fab 相互作用时，也引起 CPL 光谱变化。不过，这种变化和整个抗体分子和抗原相互作用时观察到的有明显的不同。这提示 Fc 和 Fab 之间可能存在相互作用，并导致 Fc 的构象变化。小分子的半抗原无论和完整的抗体分子或其 Fab 片段结合时，都不能引起 CPL 光谱变化（Jaton 等，1975；Schlessinger 等，1975）。比较抗溶菌酶"环肽"抗体和这一单价抗原决定簇或双价抗原["环肽"的双体衍生物（bis-loop）]、多价抗原（poly-valent antigen loop-A—L）相互作用时的补体固定能力和 CPL 光谱变化，结果发现抗体的两个结合位点必须都和抗原结合时才能固定补体。只有一个结合位点和抗原决定簇结合时，虽然也能引起 Fc 的某些构象变化，但不足以激活其固定补体的功能（Pecht 等，1977）。

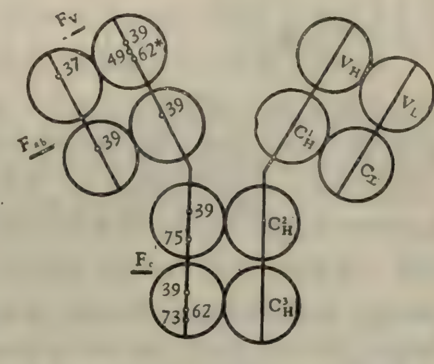


图 7-33 色氨酸在免疫球蛋白各功能区的分布。每一功能区排列顺序从 1 开始。数据根据人、小鼠和家兔的免疫球蛋白。*为家兔所特有（据 Givol 等，1974）。

当抗体的链间二硫键还原时，抗原诱发的 Fc 部分的构象变化便消失了。这提示从 Fab 到 Fc 构象变化的传递需要"铰链区"二硫键的存在（Schlessinger 等，1975）。



图 7-34 CPL 光谱测量表示的抗原诱发的抗体色氨酸不对称性的改变之示意图（据 Givol 等，1974）。

然而，也有人对"铰链区"二硫键的作用有不同的解释。Isenman 等（1975）发现人 IgG_1 髓细胞瘤蛋白之"铰链区"二硫键还原时，便失去结合 C1 的能力。但是，此 IgG_1 的 Fc 片段，不论其链间二硫键是否存在都能结合 C1。更为有趣的是，已知 IgG_4 的完整分子不能结合 C1。可是，它的 Fc 片段却能和 IgG_1 的 Fc 片段一样结合 C1。根据这些事实，该作者提出一个新的解释，认为链间二硫桥对 IgG_1 完整分子结合补体的重要性主要是影响分子的柔曲性，而不是影响 C1 结合位点本身的构象。也就是说，和抗原结合时，Fc 和 Fab 相互作用并引起它们相对的空间位置的改变，从而使原来被阻碍的补体结合位点暴露出来。并且 Fc 和 Fab 间的这种相互作用，只有在"铰链区"的二硫桥存在时才能实现。至于 IgG_4，由于其"铰链区"的特殊结构，不能实现这种改变。因此，其 Fc 上虽有补体结合位点存在，由于空间障碍也不能起作用。

2. IgG_1(Kol.) 的 X 射线晶体分析

正如同对于抗原结合位点结构和功能的研究一样，X 射线晶体分析对于抗体分子 Fc 的结构和变构作用提供的证据同样是最有决定意义的。近来，Huber 实验室发表了对 IgG_1（Kol.）低分辨率（5 Å）的分子构造（Coleman 等，1976）。从这种低分辨率的分子模型上只能分出几个功能区的空间排布，而不能分清结构的细节。然而，抗体分子 Fc 区域没有电子密度。根据 X 射线晶体分析的经验，晶体的某一部分或侧链，只有在晶格中占有固定的空间位置时，才能显示其电子密度的分布。因此，从上述事实必然得出的

结论是，Fc 在晶格中没有固定的位置，相对于固定 Fab 区至少有两种可能的空间排列。或者形象地说，抗体分子的尾巴——Fc 会“摇晃”。

根据这一观察以及其他事实（Huber 等，1976），作者们假定抗体分子在电子密度消失的部位，即紧靠重链间二硫桥 C 端的位置存在一个新的“铰链区”（换句话说，Fc 在紧靠 C_H^2 功能区前的一段肽链有柔曲性）。此外，在抗体 Fab 臂的 V、C 功能区的转折处也存在一个新的“铰链区”。由于存在这两个新的“铰链区”，抗体分子就成为一个能象肘臂那样曲伸自如的变构蛋白。当抗体的抗原结合位点和抗原结合时，分子就可能象肘臂一样弯曲，促使 Fab 和 Fc 之间，以及 C_H^1 和 C_H^2 之间贴近。由于这些关节区相继扣紧，原来柔曲的分子就变硬，变成更密实的构象，结果便能将变构效应从一个功能区传递到另一个功能区，引起 Fc 构象变化，激活结合补体的功能。对抗体分子内部，功能区之间的相对运动作的理论分析也支持这一假说（MacCammon 和 Karplus, 1977）。不过，对于这一假说的最后验证还有待于对 IgG_1(Kol.) 抗体半抗原复合物的进一步研究。

简短的结论

1. 脊椎动物的几类抗体（免疫球蛋白）中，IgG 是研究得最清楚的，可作为各类抗体结构的代表。一个 IgG 分子（分子量约为 150,000）具有四条多肽链的基本构造：两条相同的轻链（分子量＝20,000—25,000）和两条相同的重链（分子量约为 55,000）被二硫键和其他非共价键连接起来。蛋白酶能够在分子的“铰链区”把 IgG 分子切成几个主要的片段：“抗原结合”片段（Fab 或 Fab′），“结晶片段”（Fc）。Fab 或 Fab′ 是整条轻链和重链的 N 端半条（即 Fd 或 Fd′）构成的。Fab 或Fab′ 含有抗原结合位点。Fc 含有固定补体的部位等效应器。

2. 抗体是多种多样的免疫球蛋白的混合物，很难作结构分析。因此，免疫球蛋白一级结构分析是用成分均一、得量大的髓细胞瘤蛋白质作材料的。目前已经测定了一种人 IgG_1（Eu）的全部一级结构和二硫键的位置，可作为 IgG 结构的代表。和其他许多种髓细胞瘤蛋白质氨基酸排列顺序相比较，发现重链和轻链都可以分成易变区（V）和不变区（C）；重链的易变区（V_H）和轻链的易变区（V_L）是同源的，并且长度相似。重链的不变区（C）含有三个同源区（C_H^1, C_H^2, C_H^3），它们又和轻链的不变区（C_L）同源，长度也相似。易变区和不变区的每一个同源区都各有一个链内二硫键，连接两个半分子的重链间二硫键集中分布在重链的中部狭仄部位。所有这些材料均支持这样的假说：在免疫球蛋白早期进化过程中，V 基因（决定抗原结合专一性）和 C 基因（决定抗体其他功能）发生异趋之后，抗体分子的进化可能是通过基因倍增和基因移位进行的。因此，抗体的重链和轻链可能是由 V、C 基因融合成的一个 VC 基因来确定的（基因移位假说）。另一方面，分子内部的同源性和对称性提示，同源区可能具有类似的立体结构并分担至少一种免疫学功能（功能区假说）。这两种假说都是和抗体分子沿肽链的长度的结构和功能的分化是一致的。

3. 电子显微镜观察和 X 射线晶体分析测定了 IgG 分子的形状和大小。晶体分析和其他物理学方法测定的结果表明，游离的 IgG（Dob）分子可能呈“T”字形。Fab′ 片段的晶体分析表明存在两个球状结构亚基，相当于由重链和轻链组成的易变区（V）和不变区（C）。高分辨率（2.8 Å）立体结构模型上，还可以追溯结构亚基内肽链盘曲走向

和氨基酸排列顺序。各功能区有相似的总空间构象。其内部不存在 α-螺旋构造，而存在 β-构造。这对功能区假说是一个有力的证明。抗体和抗原结合能引起分子的变形和内部构象的变化，激发 Fc 部分的效应器功能（固定补体等）。关于这种分子变构作用的细节目前还有不同的看法。

4. 最后，经过广泛的比较研究发现，上述的 IgG 分子的四条链的基本构造适用于所有已知的脊椎动物的免疫球蛋白。此外，同一物种的各类和亚类的免疫球蛋白都具有四条链的基本结构。它们的区别在于重链结构和链间二硫键的数目和位置的不同。

参 考 资 料

Allan, R. and Isliker, H. (1974). Studies on the complement-binding site of rabbit IgG. I. Modification of tryptophan residues and their role in anticomplementary activity of rabbit IgG. Immunochemistry **11**, 175.

II. The reaction of rabbit IgG and its fragments with C1q. *Immunochemistry* **11**, 243.

Amzel, L. M., Chen, B. L. Phizackerley, R. P., Poljak, R. J. and Saul, F. (1974). High resolution x-ray diffration studies of the Fab' fragment of IgG New. Progress in Immunol. II., Vol. 1, Immunochemical aspect, p. 85.

Ashman, R. F., Kaplan, A. P. and Metzger, H. A. (1971). A search for conformational change on ligand binding in a human macroglobulin. I. and II. *Immunochemistry* **11**, 627; 643.

Brown, J. C. and Kosland, M. E. (1975). Activation of antibody Fc function by antigen-induced conformational changes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **72**, 511.

Cathou, R. E. and O'Konski, C. T. (1970). A transient electric birefringence study of the structure of specific IgG antibody. *J. Mol. Biol.* **48**, 125.

Cathou, R. E., Kulczycki, A. and Haber E. (1970). Structural features of γ-globulin, antibody, and their fragmonts Circular dichroism studies *Biochemistry* **7**, 3958.

Cathou, R E., Holowka, D. A. and Chen, L. M. (1974). Conformation and flexibility of immunoglobulins Progress in Immunol. II. Vol. 1, Immunochemical aspect, p. 63.

Cohn, S. and Thrascher, S. (1973). Chemical modification of Fc dependent function of antibody In: "Specific receptors of antibodies, antigens and cells". 3rd Int. Convoc. Immunol. Karger, Basel, p. 218.

Colman, P. M., Deisenhofer, J., Huber, R. and Palm, W. (1976). Structure of human antibody molecule Kol (IgG): an electron density map at 5Å resolution. *J. Mol. Biol.* **100**, 257.

Davies, D. P. and Sarma, R. (1971). X-ray diffraction and electron microscope studies on a crystalline human Ig. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 122.

Dorrington, K. J. and Tanford, C. (1970). Molecular size and conformation of immunoglobulins. *Advance in Immunol.* **12**, 333.

Dorrington, K. J. and Painter, R. H. (1974). Functional domains of immunoglobulin G. Progress in Immunol. II. Vol. 1, p. 75.

Edelman, G. M. (1959). Dissociation of γ-globulin. *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 3155.

Edelman, G. M. (1970). The covalent structure of a human γG immunoglobulin. XI. Functional implications. *Biochemistry* **9**, 3197.

Edelman, G. M. and Poulik, M. D. (1961). Studies on the structural units of the γ-globulins. *J. Exp. Med.* **113**, 861.

Edelman, G. M., Olins, D. E., Gally, J. A. and Zinder, N. D. (1963). Reconstitution of immunologic activity by interaction of polypeptide chains of antibodies *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **50**, 753.

Edelman, G. M., and Gally, J. A. (1964). A model for the 7S antibody molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **51**, 846.

Edelman, G. M., and Gally, J. A. (1967). Somatic recombination of duplicated genes: an Hypothesis on the origin of antibody diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **57**, 353.

Edelman, G. M., Gall, W. E., Waxdal, M. J. and Konigsberg, W. H. (1968). The covalent structure of a human γG-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule. The polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry* **7**, 1950.

Edelman, G. M. Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U. and Waxdal, M. J.

(1969). The covalent structure of an entire γG immunoglobulin molecule. *Proc. Nat. Acad Sci.* (U. S. A.) **63**, 78.
Ellersen, J. R., Yasmeen, D., Painter, R. H. and Dorrington, K. J. (1976). Structure and function of Ig domains. III. Isolation and characterization of a fragment corresponding to the C_γ^2 homology regions of human IgG. *J. Immunol.* **116**, 510.
Elson, J., Jenkinson, E. J. and Billington W. D. (1975). Fc receptors on mouse plancenta and yolk sac cells. *Nature* **255**, 412.
Frangione, B. and Milstein, C. (1968). Variations in the S-S bridges of immunoglobulins G: interchain disulphide bridges of G_3 myeloma proteins *J Mol. Biol.* **33**, 983.
Frangione, B., Milstein, C. and Pink, J. R. L. (1969). Structural studies of IgG. *Nature* **221**, 145
Gall, W. E. and Edelman, G. M. (1970). The covalent structure of a human G-immunoglobulin. X. Intrachain disulphide bonds. *Biochemistry* **9**, 3188.
Ghose. A. C. and Jirgensons. B. (1971). Circular dichroism studies on the variable and constant halves of kappa-type Bence-Jones proteins. *B. B. A.* **251**, 14.
Givol, D., Pecht. I., Hochman, J., Schlessinger, J. and Steinberg, I. Z. (1974). Conformational changes in the Fab and Fc of the antibody as a consequence of antigen binding. Progress in Immunol. II., Vol. 1., Immunochemical aspect, p. 39.
Green, N. M. (1969). Electron microscopy of the immunoglobulins. *Advan. Immunol.* **11**, 1.
Hellingwerf, K. J. Seijen, H. G. and Gruber, M. (1974). Preparation of the domains and domain-containing fragments of the human chain. *J. Immunol. Metho.* **4**, 229.
Hill R. L., Delaney, R., Fellows, R. E., Jr. and Lebovits, H. E. (1966). Studies on the amino acid sequence of heavy chains from rabbit immunoglobulin G. *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **165**, 159.
Hilschmann, N. and Craig, L. C. (1965). Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **53**, 1403.
Huber, R., Deisenhofer, J. Colman, P. M., Matsushima, M. and Palm, W (1976). Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature* **264**, 415.
Hyslop. N. E., Dourmaskin, R. R., Green, W. M. and Porter, R. R. (1970). The fixation of complement and the activated first component (C1) of complement by complexes formed between antibody and divalent hapten. *J. Exp. Med.* **131**, 783.
Ishizaka, T., Ishizaka, K. and Borsos T. (1961). Biological activity of aggregated γ-globulin. IV. Mechanism of complement fixation. *J. Immunol.* **87**, 433.
Isenman, D. E., Dorrington, K. J. and Painter, R. H. (1975). The structure and function of immunoglobulin domains. II. The importance of interchain disulfide bonds and the possible role of molecular flexibility in the interaction between IgG and complement *J. Immunol.* **114**, 1726.
Jaton, J. C., Huser, H., Braun, D. G., Givol, D. Pecht, I. and Schlessinger, J. (1975). Conformational changes induced in a homogeneous anti-type III pneumococcal antibody by oligosaccharides of increasing size. *Biochemistry* **14**, 5312.
Koch. G., Seijen. H. G. and Gruber. M. (1973). Domains in Ig: demonstration in human γ-chains. *Immunochemistry* **10**, 139.
Kehoe, J. M. and Fougereau M. (1970). Immuglobulin peptide with complement fixing activity. *Nature* **224**, 1211.
Kornfeld, R., Keller, J., Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1971). The structure of the glycopeptide of human γ G myeloma proteins. *J. B. C.* **246**, 3259.
Labaw, L. W. and Davies, D. R. (1971). An electron microscopic study of human γ G_1 immunoglobulin crystals. *J. B. C.* **246**, 3760.
Lancet, D. and Pecht, I. (1976). Kinetic evidence for hapten-induced conformational transition in immunoglobulin MOPC460. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**, 3549.
MacLennan, I. C. M., et al. (1973). Effector activating determinants on IgG. I. The distrbution and factors influencing the display of complement, neutrophil and cytotoxic B-cell determinants on human IgG subclasses. *Immunol.* **25**, 459.
McCammon, J. A. and Karplus, M. (1977). Internal motions of antibody molecules. *Nature* **268**, 765.
McNabb, T., Koh, T. Y., Dorrington, K. J. and Painter, R. H. (1976). Structure and function of immunoglobulin domains. V. Binding of IgG and fragments to plancental membrane preparations. *J. Immunol.* **117**, 882.
Milstein, C. and Munro, A. J. (1970). The genetic basis of antibody spicificity. *Annual Rev. Microbiol* **24**, 335.
Milstein, C. and Pink, J. R. L. (1970). Structure and evolution of immunoglobulins. *Progr. Biophys. &*

Mol. Biol. **20**, 211.

Natvig, J. B. and Turner, M. W. (1970). Rheumatoid anti-Gm factors with specificity for the pFc' subfragment of human immunoglobulin G. *Nature* **225**, 855.

Noelken, M. E., Nelson, C. A., Buckley, C. E. and Tanford, C. (1965). Gross conformation of rabbit 7S γ-immunoglobulin and its papain cleaved fragments. *J. B. C.* **240**, 218.

O'Donnell, I. J., Frangione, B. and Porter R. R. (1970). The disulphide bonds of heavy chain of rabbit immunoglobulin G. *Biochem. J.* **116** 261.

Okafor, J. O., Turner, M. W. and Hay, F. C. (1974). Localization of monocyte binding site of human immunoglobulin G. *Nature* **248**, 228.

Ovary, Z., Saluk. P. H., Quijada, L. and Lamm M. E. (1976). Biologic activities of rabbit IgG in relation to domains of the Fc region *J. Immunol.* **116**, 1265.

Padlan, E. A., Segal D. M., Spange, T. F., Davies, D. R., Rudikeff, S. and Potter, M. (1973). Structure at 4.5 Å resolution of a phosphoryl-choline-b inding Fab. *Nature New Biol.* **245**, 165.

Pecht, I., Ehrenberg, B., Calf E. and Arnon, R. (1977). Conformational changes and complement activation induced upon antigen binding to antibodies. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **74**, 1302.

Pink, J. R. L., Buttery. S. H., de Vries. G. M. and Milstein, C. (1970). Human immunoglobulin sub classes. Partial amino acid sequence of the constant region of a γ4 chain. *Biochem. J.* **117**. 33.

Piltz, J. Kratky O., Licht, A. and Sela, M. (1973). Shape and volume of anti-poly (D-alanyl) antibodies in the presence of and absence of tetra-D-alanine as followed by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* **12** 4998.

————, (1975). Shape and volume of fragments Fab'and $(Fab')_2$ of anti-poly (D-alanyl) antibodies in the presence and absence of tetra-D-alanine as determined by small-angle X-rayscattering. *Biochemistry* **14**, 1326.

Pilz, J. Puchwein, J. Kratky, O.. Herbst, M., Haager, O., Gall, W. E., and Edelman, G. M. (1970) Small angle X-ray scattering of a homogeneous γG_1 immunoglobulin. *Biochemisty* **9**, 211.

Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey. H. P., Becka. L. N. and Nissonoff, A. (1972). Structure of Fab'new at 6Å resolutin. *Nature New Biol]* **235**, 137.

Boljak, R. J., Ambel, L. M. Avey H. P., Chen, B. L., Phzackerley, R. P. and Saul, F. (1973). Thredimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 3305.

Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, **73**, 119.

Ramasamy, R., Seeher, D. S. and Adetugbo, K. (1975). C_H^3 domain of IgG as binding site to Fc receptor on mouse lymphocytes. *Nature* **253**, 656.

Schleissinger, J., Steinberg, J. Z., Givol. D., Hochman, J. and Pecht, J. (1975). Antigen-induced conformational changes in antibodies and their Fab fragments studied by circular polarization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **72**, 2775.

Segal, D. M., Padlan, E. A. Cohen, G. H., Silverton, E. W., Davies, D. R., Rudikoff, S. and Potter. M. (1974). The structure of McPC603 Fab and its hapten complex. Progress in Immunol. II., Vol. 1, Immunochemical aspect, p. 93.

Smyth. D. S. and Utsumi, S. (1967), Structure at the hingd region in rabbit immunoglobulin G. *Nature* **216**, 332.

Turner, M. W., Stanworth, D. R., Normansell, D. E. and Bennich, H. H. (1969). Some biological activities associates with the Fc' and pFc' subfvagments of immunoglobulin G. *B. B. A.* **188**. 265

Valentine R. C., and Green, N. M. (1967). Electron microscopy of an antibody-hapten complex. *J. Mol Biol.* **27**, 615.

Wahl, P. (1969). (Measurments of decays of the polarized fluorescence of the 5-dimethylaminonaphthalene-I-sulphonyl-γ-globulin). (in French). *B. B. A.* **175**, 55.

Warner, C. and Schumaker, V. (1970). Detection of a conformational change in an anti-hapten-antibody system upon interaction with divalent hapten. *Biochem. J.* **9**, 451.

Werner, T. C. Bunting, J. R. and Cathou R. E. (1972). The shape of IgG molecules in somtion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 795.

Yasmeen, G. D., Ellerson, J. R., Dorrington, K. J. and Painter, R. H. (1976). Structure and function of Ig domains. IV. The distribution of some effector functions among the C_r^3 and C_r^3 homology regions of human IgG *J. Immunol.* **116**, 518.

Yguerabide J., Epstein, H. F., and Stryer, L. (1970). Segmental flexibility in an antibody molecule. *J. Mol. Biol.* **51**, 573.

第八章　多聚体免疫球蛋白：IgM 和 IgA

高分子量的抗体是四条链的亚基经共价键连接而成的多聚体，如哺乳动物血清中的 Ig M 是五聚体，分泌性 Ig A 是二聚体。除重链和轻链之外，它们还含有“J”链。这些多聚体免疫球蛋白的结构和功能的特点将在下面分别讲述。

一、免疫球蛋白 M(IgM)

Ig M 是新生动物、初级免疫反应以及某些自身免疫病（如类风湿性关节炎）中的主要抗体。正常免疫过程中，各类抗体的血清含量有一个消长过程。Ig M 抗体总是最先出现，然后逐渐下降，而 Ig G 则随之逐渐升高。当能作直接比较时，Ig M 对颗粒抗原的结合总比其他抗体牢，凝集效价也高许多。当用红血球作抗原时，Ig M抗体的溶血效力比其他抗体高许多倍。这些免疫学功能上的特性是和 Ig M 化学结构的特点有关的。

（一）IgM 分子的一般结构

Ig M 是大分子量的抗体（分子量为 900,000，19S）。人巨球蛋白质血病（Waldenström macroglobulinemia）的巨球蛋白质，如 Ig M（lay.）已证明有抗体活力，能和人 Ig G 专一地结合。因此，可作为 IgM 分子的代表。目前研究得最清楚的是巨球蛋白质 Ig M（Ou）。当 Ig M（Ou）被半胱氨酸、巯基乙基铵、二硫苏糖醇（DTT）等 SH 试剂还原，再烷基化后，可解离成五个稳定的亚基（Ig Ms）。这表明 Ig M 分子是一个五聚体。每一个亚基的分子量为 180,000；具有类似 Ig G 的四条链的基本结构（图 8-1）。如第六章所述，各类免疫球蛋白化学结构的主要区别是重链类别不同，而轻链是相同的。

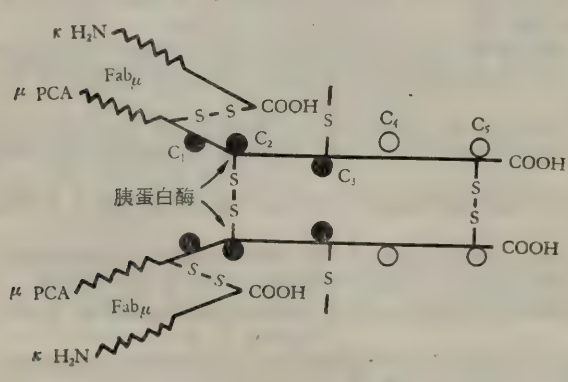


图 8-1　人巨球蛋白 IgM（Ou）单体之肽链结构（据 Feinstein 等，1971）。

Ig Ms 亚基具有两条相同的重链（μ）和两条相同的轻链（κ 或 λ），由四对链间二硫键连接起来。同一 Ig M 分子（五聚体）内，所有轻链都属于同一型，如为 κ 型则均为 κ 型，如为 λ 型则均为 λ 型，绝对没有既有 κ 链又有 λ 链的混杂分子。新近还发现每一个五聚体IgM分子含有一条特别的“J”链。因此，Ig M 的分子式按肽链组成可写为 $(\mu_2\kappa_2)_5$-J 或 $(\mu_2\lambda_2)_5$-J。各 Ig Ms 亚基又经过亚基间二硫键相连成环形（图 8-2）。每一个亚基有两个抗

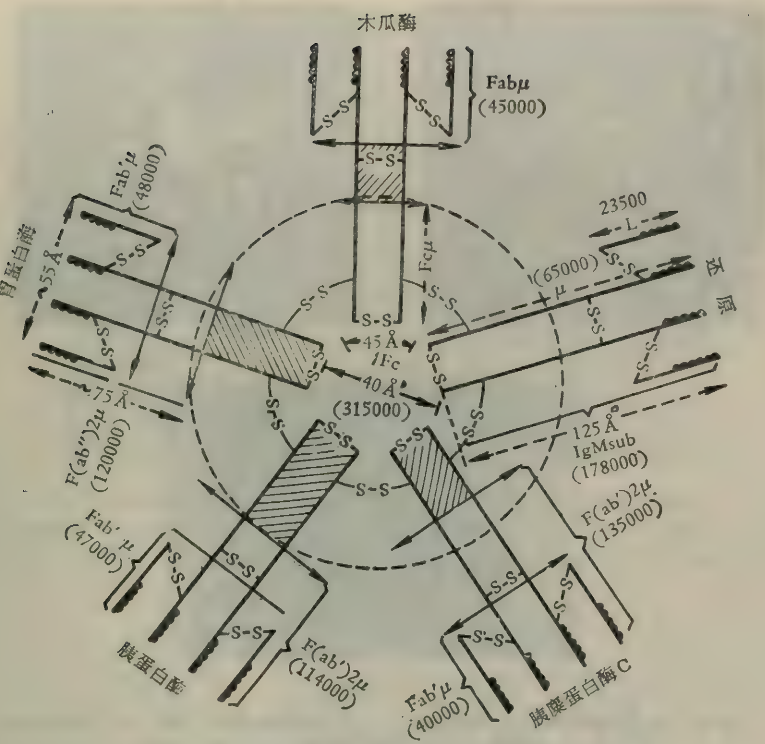


图 8-2 人 IgM 五聚体构造简图，示酶解分析结果(据 Dorrington 和 Mihaesco, 1970)。

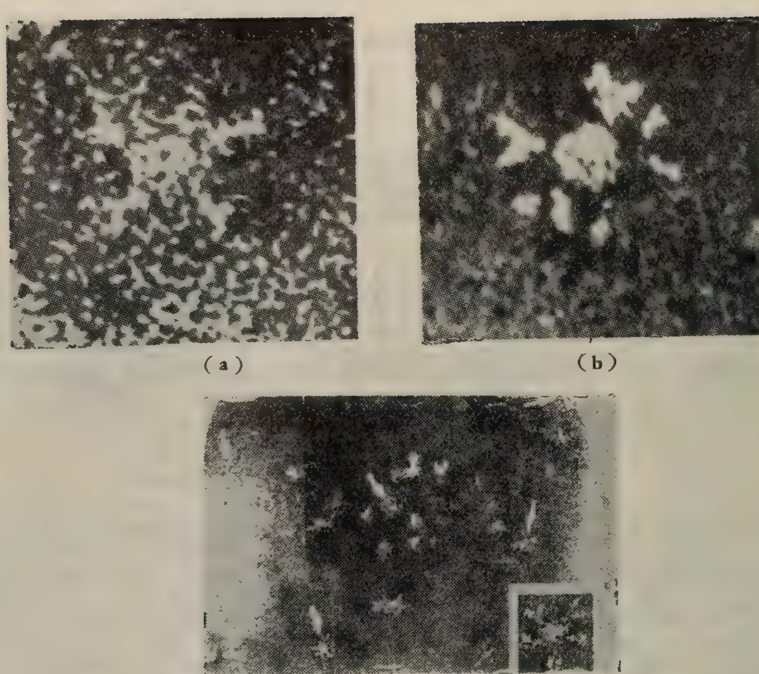
原结合位点，位于重链和轻链易变区的末端。因此，Ig M 抗体从化学结构上看是 10 价的。但实际上常常是作为 5 价起作用的。有人认为这是由于在与抗原大分子结合时受到空间限制的缘故 (Metzger, 1970)。

Ig M 经胰蛋白酶处理可得到 $F(ab')_{2\mu}$ 片段；进一步消化得到 Fab′μ 片段。每一个亚基产生两个 Fab′μ 单位。Ig M 分子共计产生 10 个 Fab′μ 单位。Fab′μ 具有一个抗原结合位点。$F(ab')_2\mu$ 片段是两个 Fab′μ 片段，由二硫键 2（及与二硫键相连的 μ_2 肽段）相连而成的。Fab′μ 则失去 μ_2 肽段及二硫键 2，只剩下连接 μ 重链和轻链的二硫键 1。此外，Ig M经木瓜酶处理，还可得到 $Fc_5\mu$ 片段。完整的 $Fc_5\mu$ 片段的分子量为 320,000，还原时解离成五个非共价结合的 Fcμ 单位，如再经盐酸胍处理可进一步解离为十个单位 (Dorrington 和 Mihaesco, 1970)（图 8-2）。

（二）电子显微镜观察

游离的 Ig M 分子经过反染色后作电子显微镜观察，可见到不同形状的分子；大部分呈五角星形状（直径约为 300—310 Å），中央呈圆盘形，伸出五条臂，臂的末端常有分叉（图 8-3）。每条臂的长度约为 100 Å，粗细约为 25—30 Å；分叉长 55—70 Å，夹角约为 30°—110°，视其与分子所处的平面的相对位置而定。根据 Ig M 抗体和抗原结合情况的观察，可见到抗原结合位点位于分叉臂的末端。

依据电子显微镜观察和理化分析，绘制的 Ig M 分子形状见图 8-4。分子和亚基的立



(a) (b)

(c)

图 8-3 IgM 分子的电子显微镜图形。(a) 小鼠髓细胞瘤 IgM。(b) 鲨的 IgM、(c) 人 Waldenström IgM (据 Feinstein 等，1971)。

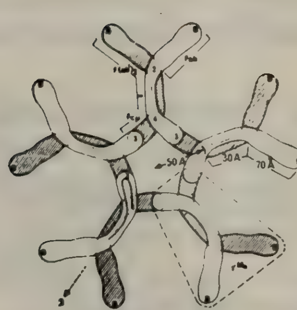
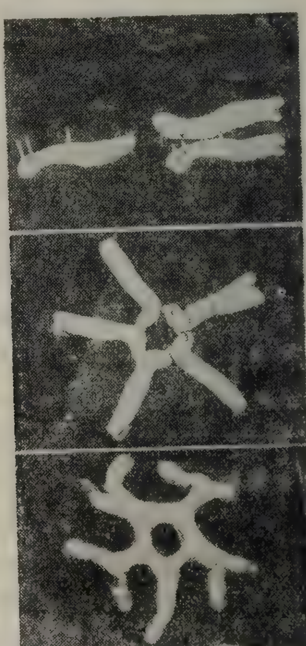


图 8-4 IgM 五聚体（根据电子显微镜观察和理化分析资料绘制）。B 为抗原结合位点。IgM 分子内，亚基间和亚基内二硫键位置用 2,3,4,… 数字指示(据 Feinstein等,1971)。



(a)

(b)

(c)

图 8-5 IgM 分子及其亚基的模型(据 Feinstein 等,1971)。

体模型见图 8-5。图 8-5 简略地表示亚基和分子的建造过程：重链和轻链由二硫键 1 相连而成一个初级单体，两个初级单体经过 2，4 二硫键相连成双体(图 8-5a)；5 个双体经二硫键 3 相连成环形的 Ig M 分子(图 8-5b)；Ig M 分子各亚基的臂张开，呈现电子显微

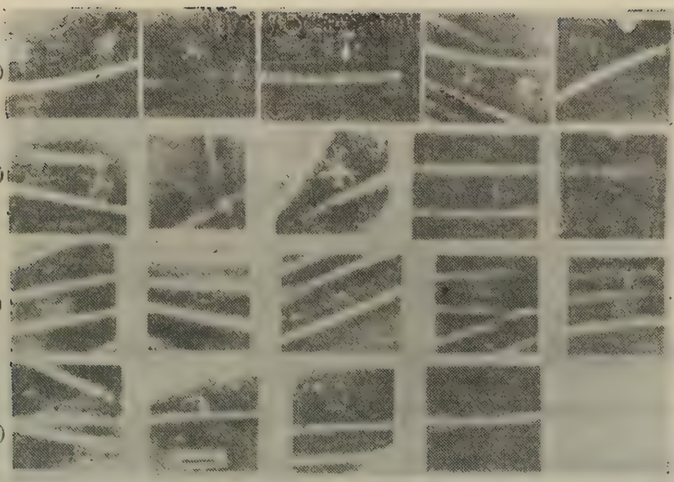


图 8-6 IgM 抗体和细菌鞭毛结合的电子显微镜图。 (a) 抗体分子刚和鞭毛接触。 (b) 类似的分子和两根鞭毛交叉连接。 (c) 转变成"环形钩针"的样子。 (d) "环形钩针"。 (a) ii, iii, (b) iv, v, (c) i 和 (d) iii 为家兔 IgM 抗体; (d) i, 为羊,其余为鲨。横线代表250 Å (据Feinstein 等,1971)。

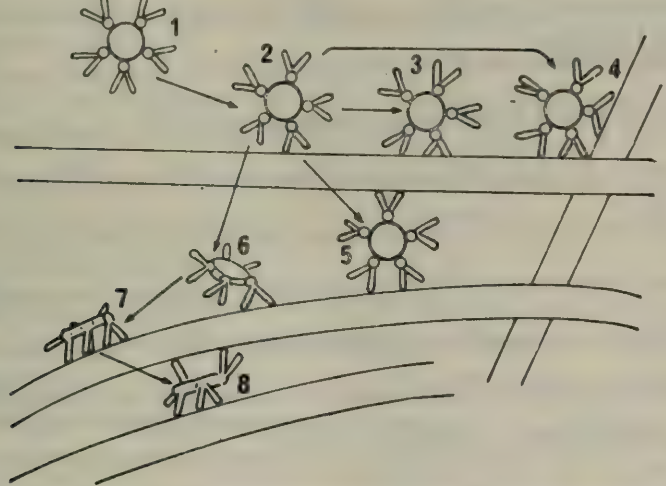


图 8-7 抗鞭毛 IgM 抗体和抗原之间的相互作用的简图。 根据图 8-6 照片绘制,说明见正文(据 Feinstein 等,1971)。

镜下显示的形态(图 8-5c)。

Feinstein 等 (1971) 观察了 Ig M 抗体分子对沙门氏菌鞭毛的附着和凝集作用 (图 8-6; 8-7)。 其过程如简图 8-7 所示: 游离的 Ig M 分子(1)通过臂的末端先和鞭毛上某一点接触(2); 然后进一步扩大和鞭毛的接触面(3), 或者和另一根鞭毛发生交叉连接(4、5); 然后经过过渡形态(6)转变成环形钩针的样子, 并和另一根鞭毛交叉连接 (7, 8); 同时, 臂和中心圆盘间可弯曲成各种角度。Ig M 抗体和脊髓灰质炎病毒颗粒连接时也可观察到类似的图象 (Svehag 和 Bloth, 1967, 1969)。萤光偏振法测量 Ig M 分子及其亚基的旋转弛豫时间的结果, 也表明 Ig M 分子和 Ig G 一样, 也具有分节柔曲性 (Zagyansky 等, 1972), 所以, 分子的形状可能呈现种种扭曲。

和 Ig G 一样, Ig M 抗体只有和抗原结合以后才能固定补体。如上述, 从电子显微

镜观察到，IgM分子和鞭毛抗原交叉连接时，Fabμ臂和中央圆盘之间的夹角常接近90°。然而在游离的IgM分子从未观察到过这种现象。因此，这种现象可能是由于IgM分子和大分子抗原的多个决定簇结合后，一些在溶液中不稳定的构象受到空间排列的限制而稳定起来了。观察到的这一现象支持前一章所叙述的抗体分子和抗原结合后引起的构象改变激发了抗体分子的补体结合部位而起作用的假说。

(三) IgM 分子的一级结构和不变区的同源性

1. IgM 分子的一级结构

IgM分子的一级结构测定工作目前已接近全部完成。Putnam 等自1971年报告了

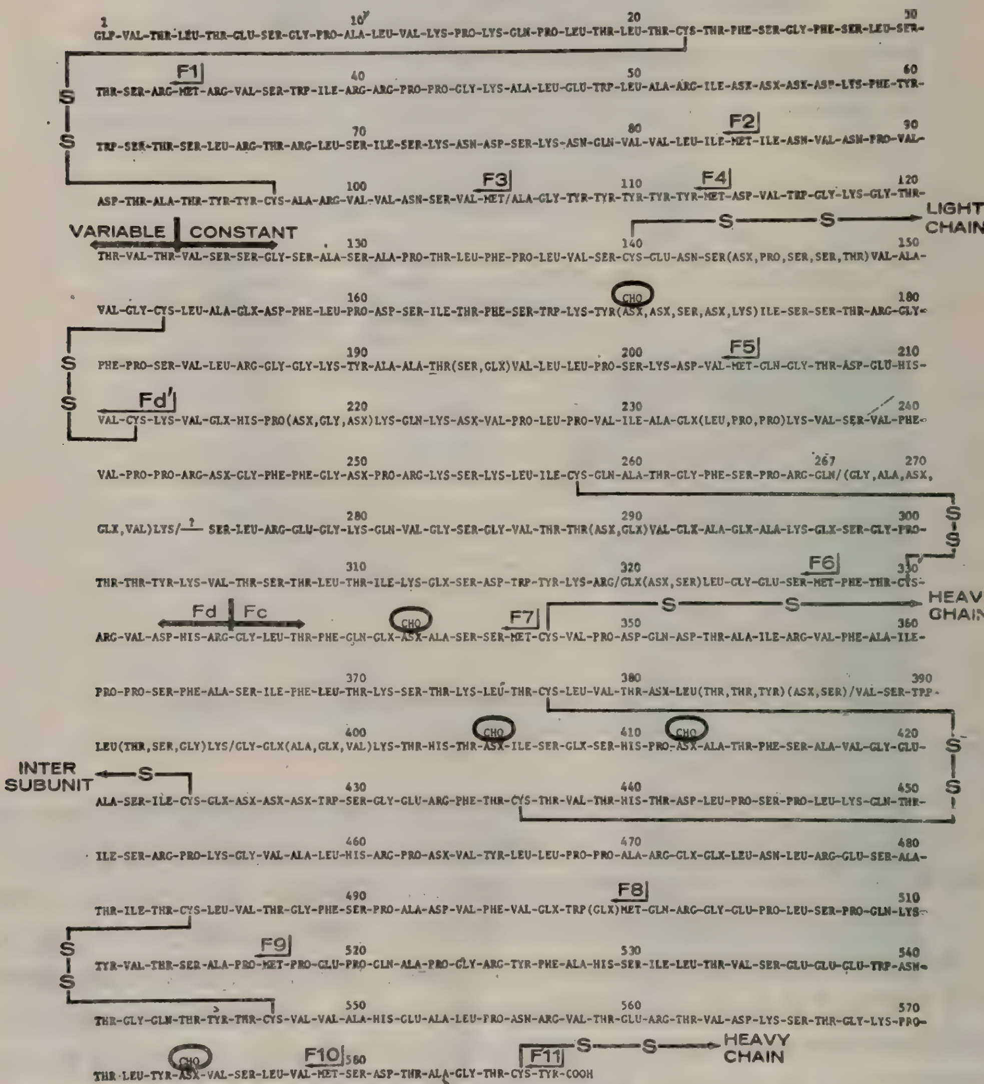


图 8-8　人类 IgM(Ou) μ 重链的氨基酸排列顺序，并示出链间和链内二硫键、低聚糖 (CHO)的位置，以及 CNBr 切断的地点及相应的片段 (F1—F11)(据 Putnam 等，1973)。

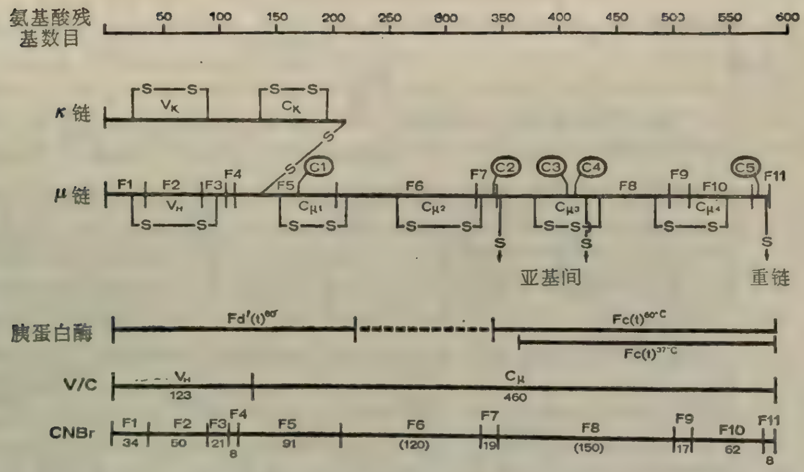


图 8-9 人 IgM(Ou) μ 重链和 κ 轻链构造简图，表示：(1) 链间和链内二硫键位置。(2) 轻链的两个同源区 ($V_κ$ 和 $C_κ$)。(3) 重链的五个同源区 (V_H 和 $C_{μ1}—C_{μ4}$)。重链简图还表示五个低聚糖 (C1—C5) 的位置，胰蛋白酶切断地点及相应的片段 (Fd′ 和 Fc)，以及 CNBr 切断地点及相应的片段 (F1—F11) (据 Putnam 等，1973)。

Ig M 巨球蛋白 (Ou) 重链 (μ) N 端的 275 氨基酸残基排列顺序以及 C 端的部分排列顺序后，又相继报告了 μ 链近 600 氨基酸残基的全部排列顺序 (Putnam 等，1971；1973)。再加上同一工作组先前报告过的 IgM (Ou) 轻链 (κ 型) 的全部排列顺序，至此整个分子的全部排列顺序除"J"链外，已经清楚了。这一工作是继 Edelman (1969) 完成 IgG 的全部化学结构测定以来，分子免疫学的又一个重要成就。Ig M (Ou) 的 μ 链的全部排列顺序及结构简图，分别见图 8-8 和图 8-9。

Ig M (Ou) 的重链(μ)有如下特点：

1) μ 链的链长为 587 氨基酸残基。和 Ig G 的 γ 链一样，μ 链也可分为易变区 (V) 和不变区 (C)。易变区包括 N 端的 123 氨基酸残基，不变区 (C) 包括 C 端 464 残基；

2) μ 链有五个同源区，除易变性的 V_H 外，还包括不变区的四个同源区 ($C_μ^1—C_μ^4$)，而 γ 链只有四个同源区。各同源区同样都具有链内二硫环；

3) 重链和轻链之间由链间二硫键相连，此二硫键在重链上位于 Cyst-140；"铰链区" (Fdμ 和 Fc 交界处) 的 Cyst-347 处有第一个重链间二硫键；近 C 末端 Cyst-586 处有第二个重链间二硫键；

4) μ 链含有五个低聚糖基团，均分布在不变区。

根据一级结构计算 Ig M (Ou) κ 链分子量为 23,367；μ 重链为 72,233 (包括五个低聚糖基团)。由此得出 Ig Ms 亚基分子量，包括低聚糖基团应为 191,200；Ig M 五聚体(不包括"J"链)应为 956,000。这和实际测量的分子量 (850,000—1,000,000) 的上限接近。

2. 同源性

Ig M 的重链和轻链同样可区分为易变区 (V_H) 和不变区 (C_H)。重链和轻链的易变区 V_H 和 V_L 共同组成抗原结合位点。重链的不变区则决定链的分类特性和一些特有的生物学功能。或者说，重链的类特征只在不变区表现出来，而不在易变区表现出来。目

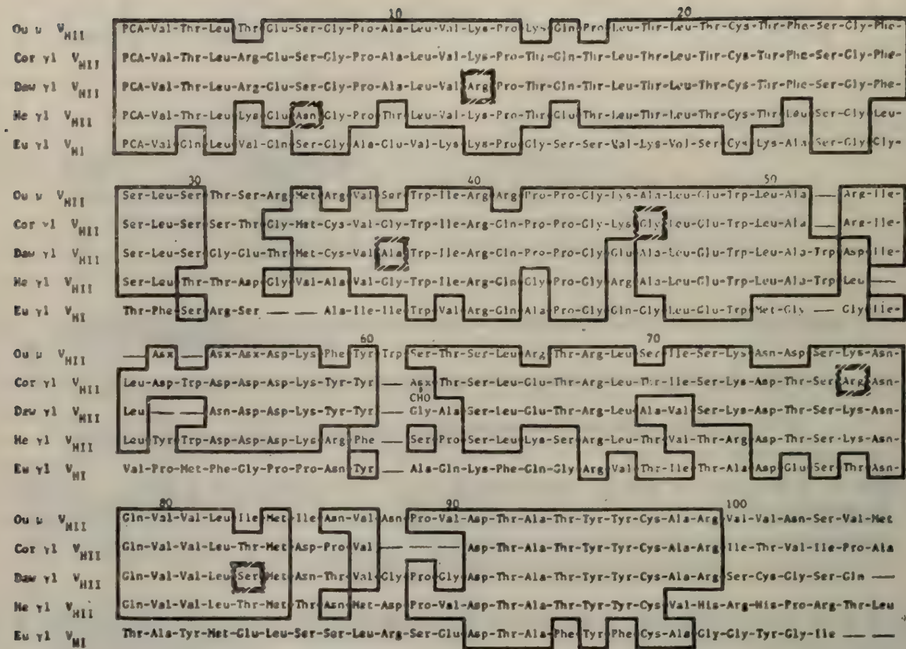


图 8-10 人类μ链 (Ou)N 端 105 残基的排列顺序与 $\gamma1$ 链 (Cor, Daw, He 和 Eu) 对应的肽段的比较。方框内为相同的残基。为了得到最大同源性，留出某些缺失肽段。μ 链 (Ou) 和 $\gamma1$ 链 (Cor, Daw, He) 同属 V_{HII}，有较大的同源性。μ链 (Ou) 和 $\gamma1$ 链 (Eu) 属于不同亚族，同源性很小(据 Putnam 等，1971)。

前至少已经知道五种人 Ig G 髓细胞瘤蛋白质的γ链的排列顺序。 比较几种γ链和μ链的易变区的排列顺序对于验证免疫球蛋白的进化和遗传机制的假说是很有意义的。

比较各类重链易变区的排列顺序时，发现可按其排列顺序的相似性划分为几个亚族 (Subgroups) (图 8—10)。人 Ig M (Ou)的μ链易变区的排列顺序和三种 Ig G 的 $\gamma1$ 链 (Cor., Daw., 和 He.) 同属于 V_{HII} 亚族。从表 8-1 可见 Ouμ 链的 N 端 100 氨基酸残基和 Cor., Daw., He. 的 $\gamma1$ 链有 61—75%同源。而 Ou μ 链与属于 V_{HIII} 亚族的 Nie. $\gamma1$ 链就只有 47% 同源；与属于 V_{HI} 的 Eu. $\gamma1$ 链的同源性更低，只有 31%残基相同。由上述可见，人类免疫球蛋白易变区属于同一亚族的μ链和 $\gamma1$ 链，在 N 端之易变区有高度的同源性。但是，当比较它们的不变区的排列时，就发现一种显然不同的现象，所有上述的五条 $\gamma1$ 链，除去 1—2 氨基酸残基外，排列顺序完全相同；反之，当把这几条 $\gamma1$ 链和μ链相比时，同源性就很低，只有 30% 同源。 从以上的比较可得出几点重要的结论：

1) 重链的类特征 (Class Character) 表现在不变区 (C_H)，而不是表现在易变区 (V_H)。这和轻链不同，轻链的易变区和不变区都表现出型的特征 (Type character)；

2) 所有属于 V_{HII} 亚族的重链易变区 (不论按其类别来自μ链或γ链) 的排列顺序具有高度的同源性。这一事实表明属于不同类别的μ或 $\gamma1$ 链之易变区彼此之间的相似程度大于属于同一类别，而不属于同一亚族的重链之易变区间的相似程度。重链之易变区 V_H 甚至和轻链的易变区 V_L 有一定程度的同源性。这些事实提示所有控制易变区的基因 (V) 可能来源于共同的祖先分子；

表 8-1　各类重链易变区前 100 氨基酸残基内排列顺序相同的残基数目(据 Putnam 等,1971)。

亚族	类	蛋白质						
V_{HII}	μ	Ou.	100					
V_{HII}	γ1	Cor.	75	100				
V_{HII}	γ1	Daw.	72	79	100			
V_{HII}	γ1	He.	61	65	64	100		
V_{HIII}	γ1	Nie.	47	47	45	40	100	
V_{HI}	γ1	Eu.	31	34	30	28	33	100
蛋白质			Ou.	Cor.	Daw.	He.	Nie.	Eu.
类			μ	γ1	γ1	γ1	γ1	γ1
亚族			V_{HII}	V_{HII}	V_{HII}	V_{HII}	V_{HIII}	V_{HI}

3）同一类免疫球蛋白重链的不变区（C_H）有几乎相同的排列顺序，而属于不同类的重链之间则同源性很低。重链的不变区（C_H）和易变区（V_H）有明显的不同，不变区保持类的特性，而易变区则适应于抗原结合位点的功能需要。这种化学结构上的区别是和关于 V、C 基因在进化过程中很早就发生异趋以及基因移位的假说是一致的。最后，从重链易变区各亚族的一级结构异同的分析，还可以推测重链易变区的各亚族在系统发生上的关系。这将留待讲免疫球蛋白进化时再讨论。

（四）糖肽段的构造与功能的关系

Ig M（Ou）的糖含量为 Ig G 的五倍。Ig M（Ou）分子的每一亚基含有十个低聚糖单位，都位于μ链上。每一条μ链含有五个低聚糖单位，均位于不变区。它们在μ链上大概的位置如简图 8-1 所示。C_1位于 Fdμ 大约 170 残基位置；C_2位于铰链区 342 位置附近；C_3，C_4，C_5位于 Fcμ。

近来，对 IgM（Ou）μ链的这五个含糖的肽段的初步测定结果（Shimizu 等,1971）介绍如下：

C_1：Phe-Ser-Trp-Lys-Tyr (Ser, Lys, Asx, Asx, Asx, CHO)

C_2：Gly-Leu-Thr-Phe-Gln-Glx-Asx(CHO)-Ala-Ser-Ser-Met-

（CHO 连于 Asx）

C_3：Val-Lys-Thr-His-Thr-Asx(CHO)

C_4：Ile-Ser-Glx (Ser, His, Pro, Asx, CHO)*

C_5：Leu-Tyr-Asx(CHO)-Val-Ser-Leu-Val-Met

* 按新发表的μ链全部一级结构(图 8-8；图 8-9)校正，此肽段的结构应改为：

-Ile(410)-Ser-Glx-Ser-His-Pro-Asx(CHO)-

按照糖分子结构的复杂程度分为两类：C_1, C_2, C_3 所含的低聚糖是高度分枝的复杂分子，是由1单位岩藻糖、2—3单位甘露糖，2单位半乳糖、3—5单位N-乙酰胺基葡萄糖和0—2单位唾酸组成；C_4、C_5 所含的低聚糖为简单的直线分子，由5—11单位甘露糖和2—3单位N-乙酰氨基葡萄糖组成。

已知人的两种巨球蛋白 Ig M（Ou）和 Ig M（Di）的糖含量、组成和排列位置大体相同（Hurst 和 Bennett，1972；Niedermier 等，1972）。这可能反映 Ig M 类的特征。

各类免疫球蛋白可能具有相同的抗原结合专一性，但却分担不同的效应器功能。这是由于多肽链结构的区域分化的结果。各类免疫球蛋白特有的效应器功能和重链不变区的特殊结构有密切关系。Ig M 分子所有五个低聚糖单位都分布在 μ 链的不变区。有人曾经根据这一特点假定 Fc 上低聚糖单位的结构和分布可能与其效应器功能有密切的关系。近来，有人证明 Ig M 的固定补体和亲合细胞的功能都是由 C^4_μ 功能区担任的（Hurst 等，1974；Moritta 等，1975；Conradie 和 Bubb，1977）。但是，利用从单株 Ig M 分离出来的两种完整的 C^4_μ 功能区片段（它们的多肽链相同，唯一的区别是一种含糖多，一种含糖少）进一步研究，发现 C^4_μ 功能区片段含糖量的多少对其亲合细胞的功能没有影响（Conradie 和 Bubb，1977），似乎不支持上述假定。

（五）“J”链和 IgM 的聚合机制

近来，在多聚体免疫球蛋白内，如 Ig M 和分泌性 Ig A，都发现存在一类新的多肽链，称为“J”链，原意为连结链（“Joining” chain）（Halper 和 Kosland，1970；Mestecky 等，1971）。“J”链的分子量为 20,100，含糖量约为 8%。它具有独特的氨基酸组成，封闭的 N 端，以及专一的抗原性。不同物种的“J”链之间有交叉反应，而与 H 或 L 链却没有交叉反应。所有这一切特性都证明它是不同于 H、L 链的独立的一类多肽链。免疫球蛋白的合成实验还提示“J”链是由产生多聚体抗体的浆细胞合成的。

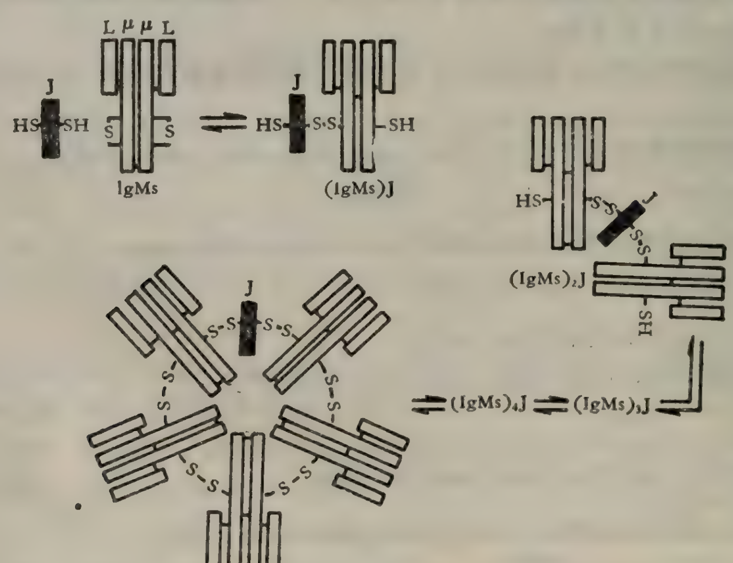


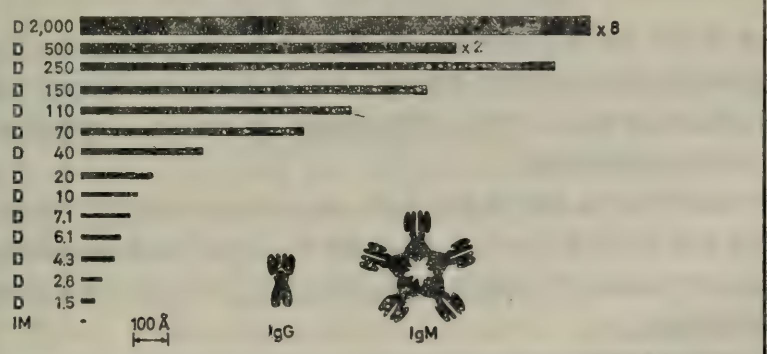
图 8-11 IgM 五聚体内 J 链的搭钩模型以及其形成过程中的二硫键交换（据 Chapuis 和 Koshland，1974）。

"J" 链的生物学功能还不太清楚。由于"J"链只在多聚体分子内存在，而不在单体内存在，定量研究还发现每一个五聚体 Ig M 含有一条"J"链，并且它是和 Fcμ，而不是和 Fabμ 片段连接，以及"J"链和 μ 链之间的二硫键可被低浓度的还原剂破坏，而释放出"J"链等事实，因而推测"J"链在天然多聚体分子中可能起连接亚基的作用。最近有人在使 Ig M 五聚体有限制还原和烷基化以后，分析切断的"J"链二硫键和释放的亚基之间的定量关系，发现：1）还原条件下可产生相当数量的单体，以及少量的二体、三体和四体；2）断开的"J"链二硫键数目和 Ig M 解聚程度之间没有对应的关系；3）有限还原的含"J"链的双体，"J"链二硫键并没有断开。这些材料表明，"J"链可能象一个"搭钩"，把两个 Ig Ms 单体连接起来。根据所观察到的各种连接方式，可以假定 Ig M 的聚合机制是从形成含"J"链的二聚体开始，并经过一系列按顺序的二硫键交换而完成的（图 8-11）（Chapuis 和 Kosland，1974；Kosland，1975）。可是，有人提出不同的看法，认为"J"链并非 Ig M 聚合作用所必需，而是和分泌功能有关系的。"J"链和上皮细胞产生的分泌片有专一的亲合力，因而假定能促使 Ig M 分泌到外分泌液内（Eskeland 和 Brandtzaeg，1974）。总之，"J"链的功能还是一个争论未决的问题。

最后，还要补充一个新发现的事实。人类正常的初乳和唾液中均证明有分泌性 Ig M 存在。纯化的分泌性 Ig M 分子含有"J"链，并且 60—70% 分子还含有分泌片。萤光标记抗体示踪研究还证明 Ig M 在结肠分泌上皮细胞内的分布和 IgA 相同（参看下节）。因此，Ig M 和 IgA 同样是分泌性抗体。不过分泌性 Ig M 的四级结构可能比分泌性 Ig A 较为松散（Brandtzaeg，1975）。

（六）IgM 抗体的有效价数

Ig M 抗体是一个五聚体，每一亚基有两个抗原结合位点。因此，Ig M 抗体从化学



	IM	D 1.5	D 2.8	D 4.3	D 6.1	D 7.1	D 10	D 20	D 40	D 70	D 110	D 150	D 250	D 500	D 2,000
IgM	10	8.9	7.3	6.2	5.8	4.9	4.8	5.0	4.9	5.3	5.2	5.1	5.1	3.9	2.3
IgG	1.9	2.1	2.0	1.9	2.1	2.0	2.2	2.2	1.9	2.3	1.9	2.4	2.0	2.0	1.1

图 8-12 抗原葡聚糖分子大小和 IgM 抗体实测的价数的关系。上方示各种葡聚糖分子的形状、大小以及 IgM 和 IgG 分子简图，同一放大倍数。下表表示家兔抗葡聚糖 IgM 和 IgG 抗体对不同大小的抗原相应的价数。IM 为异麦芽糖。（据 Van Oss 等，1973）。

表 8-2 文献记录的 IgM 抗体的价数

抗　　体	抗　　原	抗 原 分 子 量	实测的 IgM 价数
人类风湿性关节炎因子	IgG	160,000	5
兔 IgM	BSA	70,000	5
人 IgM	葡萄糖-d-半乳糖甘露糖-鼠李糖	632	10
兔 IgM	5-硝基-3-碘-4-羟苯基乙酸	380	10
兔 IgM	1-偶氮萘-4-磺酸	222	10
人单细胞株 IgM	DNP	184	10
大鼠 IgM	DNP	184	10

结构上看是10价的。然而，在实际测定时，Ig M 抗体的价数往往是5价。从表8-2可见，对于小分子量抗原或半抗原（分子量<1000），测定的价数是和理论上的价数符合的；对于大分子抗原，测定的价数就总是只有5价了。但是，若用同一Ig M 抗体的亚基作测定，推算出的总价数，仍然是10价。理论上可能的解释是，当和大分子抗原结合时，由于空间障碍，每一对结合位点中，只有一个实际上起作用，因此Ig M 抗体有效的价数只有5价（Metzger，1970）。

近来，有人用化学组成均一而分子量大小递增的葡聚糖作抗原，系统地分析了IgM抗体有效价数和抗原分子量大小之间的关系。当分子量从342（异麦芽糖）到1,870,000（D. 2000）范围内逐步增加时，家兔抗葡聚糖Ig M 抗体的实测的价数，从10价减少到2.3价；而在从6,000（D. 7.1）到250,000（D. 250）整个范围内，IgM都是5价的（图8-12）。这有力地证明了上述的假说，IgM抗体按本身结构应为10价，和高分子抗原结合时，有效价数的减少是由于空间障碍的结果（Van Oss 等，1973）。

小　　结

1）Ig M 是以多聚体形式存在的免疫球蛋白（人类和其他哺乳动物的IgM为五聚体，某些低等脊椎动物可能为四聚体或六聚体）。单体亚基（Ig Ms）含有两条相同的轻链（κ 或 λ）和两条相同的重链（μ）。每个五聚体还含有一条“J”链，可能起连接亚基的作用。每条 μ 链上有五个低聚糖相连。

2）已经测定了一个人类巨球蛋白 Ig M（Ou）的全部一级结构，可作为Ig M 的代表。μ 链的氨基酸排列顺序同样可分为易变区（V），包括123残基，和不变区（C），包括约460残基。μ 链共有五个同源区，即 V_H，C_μ^1，C_μ^2，C_μ^3，C_μ^4；γ 链只有四个同源区。轻链只有两个同源区。

3）μ 链的类特征只存在于不变部分（C_H），而不存在于易变部分（V_H）。各类重链的易变区（V_H）的一级结构可能存在高度的同源性，按此可区分为 μ，γ，α 链所共有的三个 V_H 亚族（V_{HI}，V_{HII}，V_{HIII}）。Ig M 和 Ig G 等其他类别的免疫球蛋白具有相同的轻链，重链也可能属于相同的 V_H 亚族。但 μ 链和 γ 链等其他类别的重链的不变部分（C_H）的同源性很低，其链长，二硫键和低聚糖的数目和位置也不相同。这些结果再次支持 H、L链的一级结构是由两个基因（V，C）共同决定的，以及V，C基因在进化过程中很早

就发生异趋和独立进化的假说。

4）重链和轻链的 V 区决定抗原结合位点的专一性，C 区决定类别专一的效应器功能和其他特性。Ig M 抗体按化学结构应为 10 价，但和大分子抗原结合时，由于空间障碍，往往表现为 5 价。

二、免疫球蛋白 A(IgA)

1954 年已经发现人血清中存在一种特殊的球蛋白成分。当时根据其电泳行为称为 β_2A球蛋白。后来发现它们具有抗体功能，是一类新的免疫球蛋白，定名为 IgA (Hermans 等，1958)。

从 30 年代起，许多临床和实验观察都注意到，在消化道和呼吸道感染中，保护性免疫力似乎和血清中的抗体没有直接的关系，而和这些粘膜面的分泌液内的抗体有关系（图 8-13)，并提出动物体除去循环抗体外，还存在局部的防御机制的假说。往后发现这些分泌液中的主要抗体就是 Ig A（Tomasi 和 Zigelbaum，1933），并且证明分泌性的 IgA 是局部产生的，它们和血清 IgA 在化学性质上是不同的。由于在对抗某些感染中，特别是局限于粘膜面的感染，局部免疫和分泌抗体起着主要的作用。因此分泌性 IgA的研究近来受到重视。

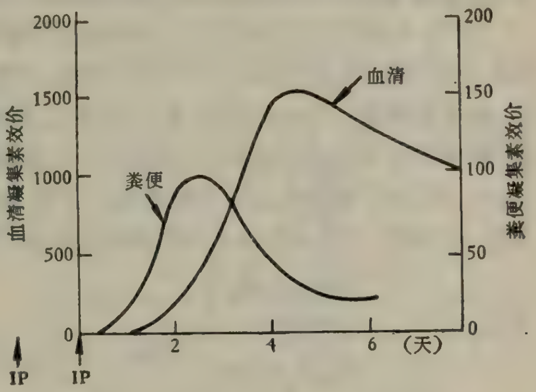


图 8-13 豚鼠经霍乱疫苗免疫后，血清和粪便中分泌抗体效价各自独立地变化。IP 示腹腔内注射（据 Tomasi，1976）。

(一) 血清 IgA 的性质和结构

人血清 Ig A 具有多种抗体活力。但是由于含量小，在血清抗体中和 Ig G、Ig M 比较，居于次要的位置。Ig A 抗体的特点是有耐热性（56°C）。过去认为 Ig A 没有固定补体的能力。然而，近来有人发现分泌性 Ig A 的 Fabα 片段能和补体成分 C 3—9 起作用，但不能和 C 1 起作用（Boackle 等，1974）。也有人报告 Ig A 及其片段经化学处理凝集后，能激活补体系统的经典途径（Lida 等，1976）。

Ig A 最显著的特性是趋向于以不同的聚合形式存在，从单体到五聚体（7S，10S，13S，15S，17—18S）。人血清中 IgA 主要以单体形式存在。在其他哺乳动物，如小鼠血清中，主要以双体形式存在。在外分泌液中和在血清中不同，所有物种都是双体占（11 S）优势，除含有“J”链外，还含有一条特殊的多肽，称为“分泌片”（“Secretory piece”）。

IgA 单体是由两条相同的重链（α 链）和两条相同的轻链（κ 或 λ 型）组成，分子量为 162,000。和 Ig G 比较，Ig A 的电泳迁移率较快，重链的含糖量较高（Ig A 约为 11%，IgG 约为 4%）。根据 α 链的抗原性的不同，Ig A 又可分为两个亚类。

1. 亚类

人类 Ig A 分成两个亚类：Ig A_1 和 Ig A_2，两者的相对含量为 9:1。这两个亚类，除去 α 链的抗原性有区别外，肽链的连接方式也不同。Ig A_1（主要成分）的重链和轻链之间由共价键(二硫键)连结。某些 Ig A_2（次要成分）的结构非常特别，两条轻链之间是由共价键连接的，而重链和轻链之间反而是非共价键连结的。后来发现这种奇特的现象只出现在 Am (2+) 的同种异型分子(高加索人的主要遗传型)，而 Am (2-) 的同种异型分子仍然具有 H—L 链间的二硫键（Jerry 等，1970）（图 8-14）。某些动物品系，如小鼠 Balb/c 品系的 Ig A 缺少 H—L二硫键，NZB 品系则保留有这种二硫键。

对 Ig A 两亚类"铰链区"氨基酸排列顺序的比较，发现 Ig A_2 Am (2+) 缺少在 IgA_1 中连接重链和轻链的 Cys-131 残基；并且前者在"铰链区"比 IgA_1 要短约 10 个残基，缺少低聚糖（Frangione 等，1972）。所有 Ig A_1 的糖组成中均含有氨基半乳糖，而 Ig A_2 则不含此成分（Abel 等，1971）。近来，从人类 α1 重链分离出两个糖多肽（1a，4a），并从 α2 链分离出三个糖多肽（1b，2b，3b）。根据氨基酸排列顺序测定结果，表明 α2 链的 1b，3b 与 α1 链的 1a，4a 似乎是相同的。1a 和 1b 同位于 C_H^2 功能区，4a，

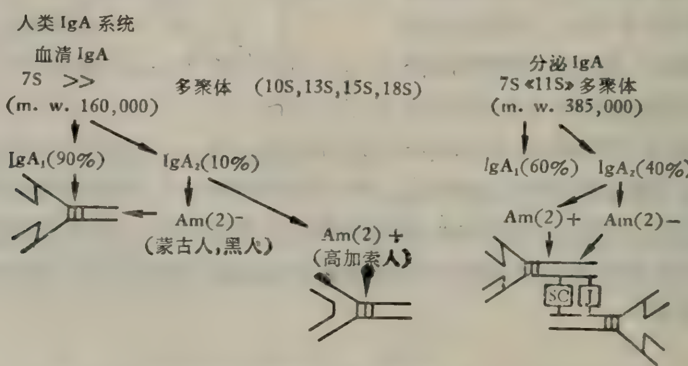


图 8-14 人类 IgA 系统的成分及其性质(据 Tomasi 等,1973)。

表 8-3 α1 和 α2 链糖多肽的排列顺序

亚 类	肽 段	排 列 顺 序	位 置
α1	(1a)	Leu-Gly-Ser-Glx-Ala-Asx(CHO)-Leu-Thr	C_H^2
α2	(1b)	Thr-Gly-Ser-Glx-Ala-Asx(CHO)-Leu-Thr Val	
α1	(4a)	Ala-Gly-Lys-Pro-Thr-His-Val-Asx(CHO)-Ser-Val	C_H^3
α2	(3b)	Leu (Ala, Gly, Lys, Pro$_2$, Thr, His, Val, Asx(CHO), Ser, Val) Val-Met	
α2	(2b)	Thr-Pro-Leu-Thr-Ala-Asx(CHO)-Ile-Thr-Lys	?

据 Jean-Pierre 等,1974。

3b 同位于 C_H^3 功能区。2 b 为 α 2 链所特有的糖多肽，在 α 1 链内从未发现过（表 8-3）（Jean-Pierre 等，1974）。所有这些都说明 Ig A 两亚类的一级结构有明显的区别。这可能和它们的高级结构的差别有关系。

2. 分子的基本结构

Ig A 单体具有四条肽链的基本结构：两条相同的重链（α）和两条相同的轻链（κ 或 λ），分子式可写为（$\lambda_2\alpha_2$）或（$\kappa_2\alpha_2$）。多肽链化学结构的研究进展较慢，主要的困难是不易得到象 Ig G 的 Fab 和 Fc 那样均一的酶解片段。从小鼠 Ig A 经木瓜酶分解后，得到的 Fc（分子量≒51,000）和 Fab（分子量≒53,000）都含糖。根据分子的肽链组成，二硫键和糖的分布的初步结果设想的小鼠 Ig A 分子的结构模型如图 8-15 所示（Grey 等，1971）。图中粗线表示不稳定的二硫键的位置。每条重链的 Fc 部分有 5 个不稳定的半胱氨酸残基，Fab 部分没有。这一模型有些类似人 Ig A_2 Am（2+）的结构。

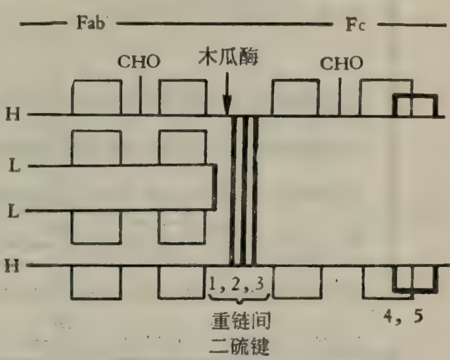


图 8-15　小鼠 IgA 分子结构模型（据 Grey 等，1971）。

3. IgA 的一级结构

1976 年 Putnam 实验室报告了人 IgA_1（Bur）髓细胞瘤蛋白质的全部一级结构，包括 α1 重链，λ 轻链的全部氨基酸排列顺序，低聚糖和二硫桥的位置（图 8-16，图 8-17）（Liu 等，1976）。

从图 8-16 可见，IgA_1（Bur）及 α1 重链的一级结构有如下的特点：

1） α 1 重链的链长为 472 氨基酸残基。同样可分为易变区（V），包括 N 端 119 氨基酸残基，以及不变区（C），包括 C 端 353 残基；

2） 和其他几类重链相比， α 1 重链的半胱氨酸含量特别丰富。 α 1 重链（有 4 功能区）含有 17 半胱氨酸残基，而 γ 1 重链（4 功能区）含有 11，μ 重链（5 功能区）含有 14，ε 重链（5 功能区）含有 15 半胱氨酸残基。除去 4 链内二硫桥以及重链和轻链间，重链彼此间的二硫桥外，α 1 重链上的某些半胱氨酸的功能不清楚。不过，位于“铰链区”的两个额外的链内二硫桥（Cys-196 至 Cys-220，Cys-242 至 Cys-299；图 8-17 内，粗线表示）或许和 Ig A 不易酶解有关系。位于 C 末端 Cys-471 的二硫桥和“J”链连接，而位于 Cys-311 的二硫桥或许和亚基间的连接有关系；

3） α 1 链的另一个特点是含糖高，共有 8 个低聚糖基团，其中 2 个位于 Fd（1 个在易变区），6 个在 Fc（5 个集中在“铰链区”）。

随着 α 链的全部一级结构的阐明，至此人类各类免疫球蛋白（Ig G，Ig M，IgA 和 IgE）的一级结构都已弄清楚了。这对于了解各类免疫球蛋白的结构和功能，以及进化上的关系是很重要的。Putnam 等比较了人 Ig M，IgA_1， IgG_1， 和 Ig E 的 Fc 的氨基酸排列顺序，发现它们有相当程度的同源性（约 30%），不过这种同源性在 Fc 上的分布是不均匀的。如 μ 链和 α 链的最后的一个功能区（C_μ^4 和 C_α^3）之间的同源性最高（约 50%），而 Fc 第一功能区（C_μ^3 和 C_α^2）之间的同源性却最低（约 13%）。这似乎提示在进化过程

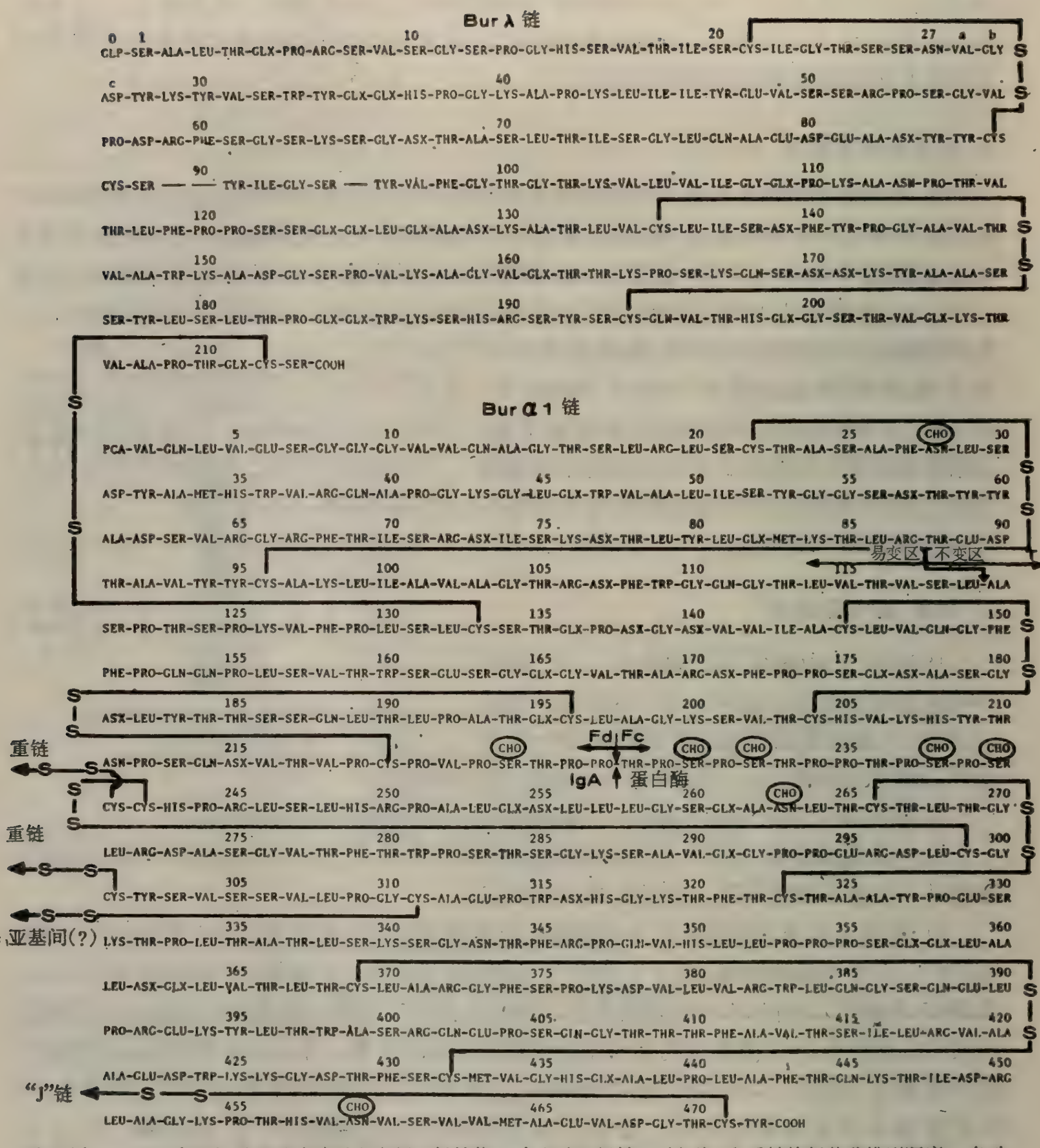


图 8-16 人 IgA_1(Bur) 单体的半分子之全部一级结构。上方为 λ 轻链，下方为 α1 重链的氨基酸排列顺序。各功能区的链内二硫桥列于图的右面；链间二硫桥及其他链内二硫桥列于图的左面。CHO 代表低聚糖。箭头指示 α1 链的易变区（V_H）和不变区（C_H）的分界位置。以及 IgA 蛋白酶酶解时 Fd 和 Fc 分界位置(据 Liu 等,1976)。

中，在保持其基本结构稳定的前提下，各功能区是以不同的突变率来演变的（Low 等，1976）。

4. 分子形状和大小

根据对人和小鼠（MOPC/315）的髓细胞瘤 Ig A 的电子显微镜观察，Ig A 双体是由两个"Y"字形单体以 Fc 顶端相连而成(图 8-18)。从表 8-4 可见 Ig A 的 Fab，Fcα 的

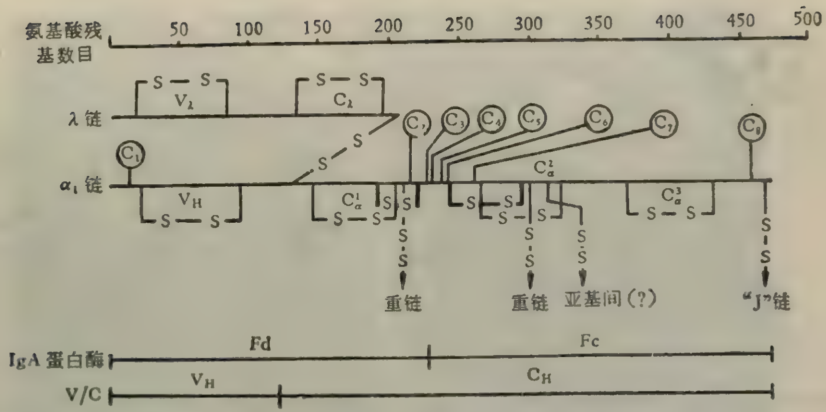


图 8-17 人 IgA_1(Bur)之 α1 重链和 λ 轻链构造简图。表示：(1) 链间和链内(粗黑线表示铰链区两个额外的二硫桥) 二硫桥的位置。(2) 轻链的两个同源区 (V_λ 和 C_λ)。(3) 重链的四个同源区(V_H 和 C_α^1—C_α^3)。(4) 七个低聚糖 (C_1—C_7) 在重链上的位置(据 Liu 等,1976,重绘)。

表 8-4 IgA 双体的大小

	长 度 (Å)		粗 细 (Å)	
	人	小鼠	人	小鼠
Fab	70	70	33	41
2×Fcα	138	122	42	51

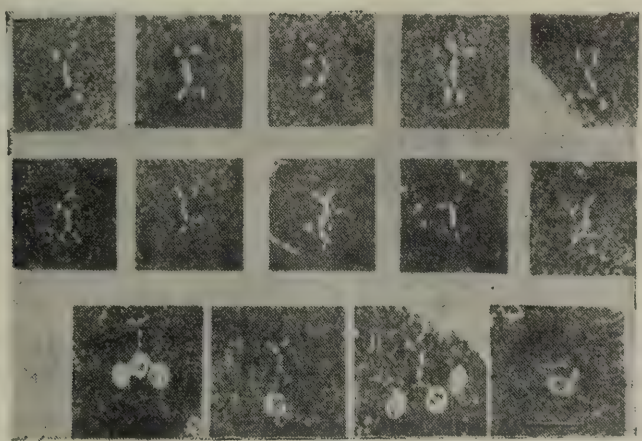


图 8-18 IgA 双体的电子显微镜图。(a) 人血清，(b) 和 (c) 小鼠 (MOPC315) 血清。(b) iii, iv, 抗体分子和 N-DNP-氨基庚酸反应。(c) 抗体分子和 DNP-铁蛋白结合，其余分子没有和抗原反应。横线代表 200 Å (据 Feinstein 等,1971)。

大小是和 Ig G 的相应的片段相近的。几个"Y"字形的单体还可以彼此的 Fc 顶端相连成辐射状排列的多聚体 (Dourmashkin 等，1971；Feinstein 等，1971；Munn 等，1971)。根据电子显微镜观察，以及 Ig A 二硫键位置等资料，提出了 Ig A 双体和多聚体的结构模式(图 8-19) (Tomasi，1976)。

当 DNP-铁蛋白抗原和 Ig A 抗体结合后，可观察到游离的 Fab 臂的末端和抗原结

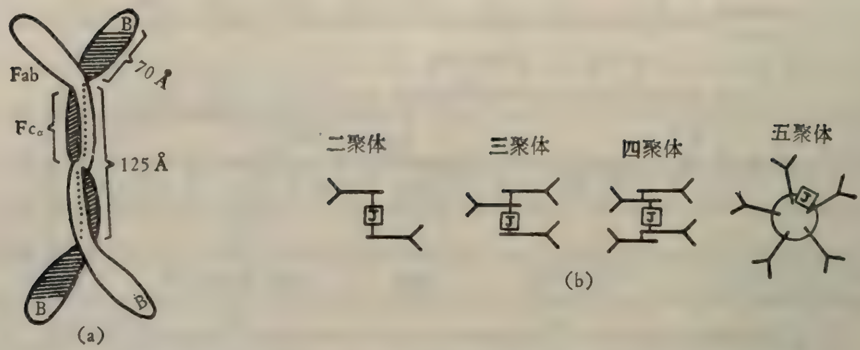


图 8-19　IgA 双体和多聚体的模式图。(a) 双体，示分子大小(据 Munn 等，1971)。(b) 各种多聚体，五聚体为类似 IgM 的环形构造(据 Tomasi, 1976)。

合，并且"Y"字形两臂间的夹角可能有大的变动，表现出相当大的柔曲性（图 8-18c）。近来，几种髓细胞瘤 Ig A 用萤光偏振实验证明，Ig A 双体和单体分子内 Fab 亚基可能自由转动，这也支持了分子有相当的柔曲性（Zagyansky 等，1974）。

（二）分泌性 IgA 的性质和化学结构

1. 分泌性免疫球蛋白及其来源

人体各种分泌液，按其所含免疫球蛋白的组成，可分为两类：

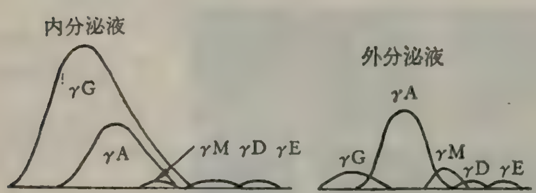


图 8-20　两种分泌液内各类抗体的相对浓度（据 Tomasi, 1976）。

1) 内分泌液。如脑脊液、羊水、腹水、胸膜液、水状液等；其中 Ig G /Ig A 比值和血清内相似（6:1）；

2) 外分泌液。如初乳、唾液、泪液、鼻涕以及呼吸道、消化道和生殖道粘膜表面的分泌液等；其中 Ig G /IgA比值一般都小于 1，不同的分泌液各有不同(图 8-20)。

总之，在大多数外分泌液中，IgA 在各类免疫球蛋白中占绝对优势（约 60—100%），而在血清中它只是较小的成分（10—20%）。这表明分泌性 Ig A 可能不是从血清中简单的渗出物，而应当有其他来源。放射性同位素标记实验证明血清 Ig A 不可能大量进入外分泌液。萤光标记抗体法还证明外分泌液中的大部分 Ig A 是由粘膜下的大量浆细胞群局部合成的(图 8-21)。这些细胞群中的绝大多数细胞都含有 Ig A。无菌的小鼠用铁蛋白经口服免疫时，几乎只产生 IgA 抗体，并且抗体的分布亦几乎限于肠道，循环抗体很少（Hermans，1970）。这些事实，以及前述血清抗体和分泌性抗体的产生是互不依赖的，都表明分泌性抗体产生系统和循环抗体产生系统是各自独立的系统。然而，近来根据对狗肠系膜淋巴液内 Ig A 含量的动态分析提示，循环内的 Ig A 可能主要是由肠道的浆细胞产生供应的(Tomasi 和 Bienstock，1968)。后来，还发现大鼠肠粘膜的浆细胞也可能是血清 Ig A 的来源（Nash 和 Hermans，1972)。此外，肠道内的 Ig A 形成细胞

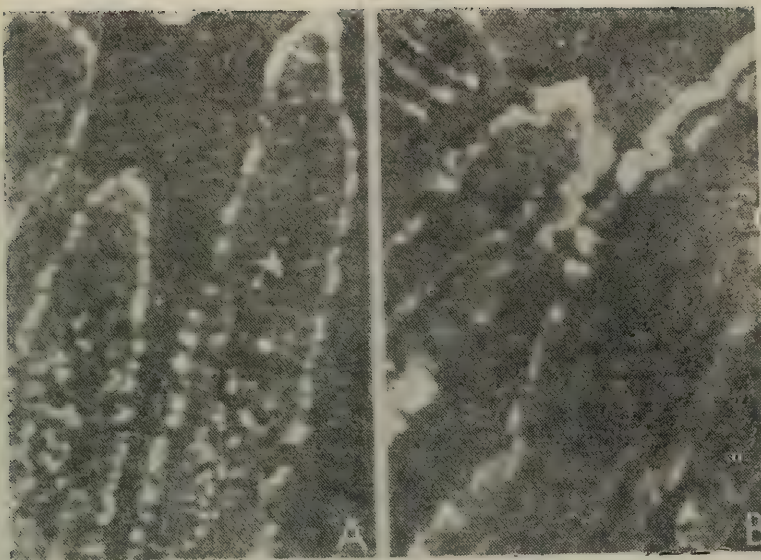


图 8-21　免疫萤光法显示小鼠肠粘膜下层内有许多含 IgA 的浆细胞群(据 Tomasi, 1976)。

也可能迁移到周沿淋巴组织并在该处产生血清 Ig A 抗体（图 8-22）（Tomasi，1976）。

2. 分泌性 IgA 的提纯

人初乳中分泌性 Ig A 的含量比较高(约 0.5—1%)。因此，Ig A 最先是从初乳中分离纯化的，步骤见图 8-23。

用霍乱毒素刺激家兔的一段小肠，从分泌液中也可以得到相当大量的 Ig A（每只家兔约 300 毫克）（Wood 和 Clem，1974）。至于血清 Ig A，可以直接从正常人血清中分离、提纯（Zschocke 等，1969）。

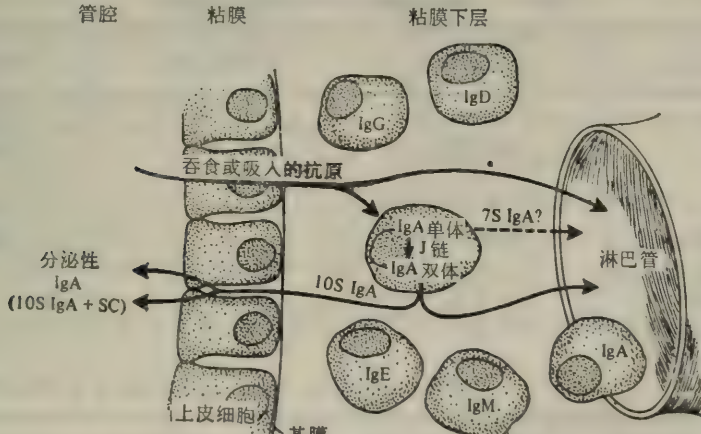


图 8-22　IgA 在粘膜面（如消化道）分泌部位的局部合成和分泌。一部分分泌性抗体通过上皮细胞进入管腔；另一部分进入淋巴管成为循环抗体(据 Tomasi, 1976)。

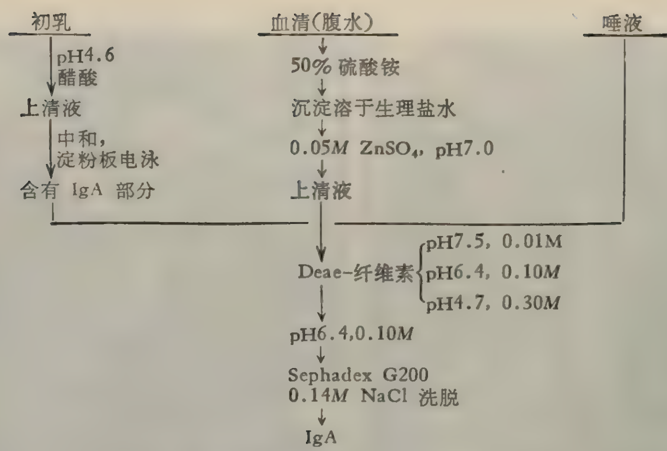


图 8-23 从人血清、腹水、初乳和唾液提取 IgA (据 Tomasi 和 Bienenstock, 1968)。

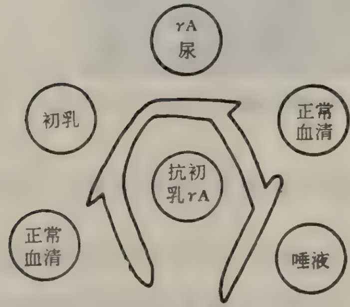


图 8-24 琼脂扩散实验表示人正常血清、尿液、初乳、唾液中的 IgA 抗原性的关系。中央孔为初乳 IgA 的抗血清，能和 IgA 及“分泌片”的决定簇起作用 (据 Tomasi 和Bienenstock, 1968)。

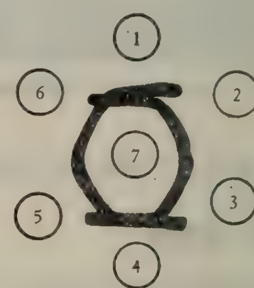


图 8-25 琼脂扩散实验表示分泌性 IgA “分泌片” (SP) 和血清 IgA 之抗原性的关系。1. 人初乳 IgA 经还原和烷基化，含有 α 链和 SP; 2. 无丙种球蛋白病人尿中之 SP; 3. 从分泌性 IgA 提取之 SP 4. 人正常唾液; 5, 6. 人正常血清; 7. 初乳 IgA 之抗血清，用 IgG 吸附后(据 Tomasi 和 Bienenstock, 1968)。

表 8-5 血清和分泌性 IgA 化学性质的比较

化学性质	人血清 IgA	人分泌性 IgA	家兔初乳 IgA
沉降常数	6.9S	11.4S	10.8S
分子量	170,000	385,000	370,000
糖			
6 碳糖(%)	5	6.2	3.2
氨基 6 碳糖(%)	2.9	4.1	3.2
岩藻糖(%)	0.22	0.73	
唾酸(%)	1.8	0.65	
二硫基克分子数/170,000 克	15	16	
Gm 因子	−	−	
Inv 因子	+	+	

3. 分泌性和血清 IgA 抗原性和化学性质的区别

用抗血清 Ig A 或髓细胞瘤 Ig A 的抗血清进行血清学分析时，发现血清 Ig A 和分

泌性 Ig A 的 α 链在抗原性上没有区别。然而，当用抗分泌性 Ig A 的抗血清进行分析时，却发现分泌性 Ig A 比血清 Ig A 多一个抗原成分(图 8-24；8-25)。分泌性 Ig A 的抗血清经过正常血清吸附后，只能与分泌性 Ig A 起反应。因此，分泌性 Ig A 应存在一个血清 Ig A 所没有的抗原成分，即所谓"分泌片"（"Secretory piece"，简称 SP)。血清 Ig A 和分泌性 Ig A 的化学性质的区别列于表 8-5。各种分泌性 Ig A 的主要成分是 11S 的二聚体(分子量 = 385,000)，并且还可能存在更大的多聚体(16—20S)。

4. "分泌片"的提纯和性质

从初乳中提纯的 Ig A（分子量 = 385,000）经过还原和烷基化后，分子发生解离。这样产生的 H 链、L 链和"分泌片"的混合物经过两次凝胶过滤，可以得到纯的"SP"（图 8-26)，其理化性质列于表 8-6。某些患丙种球蛋白缺乏症的病人，分泌液中有游离的"SP"存在，其免疫学性质和上述纯化的"SP"相同。

关于"SP"和 Ig A 连接的方式尚无定论。根据 Hong 等(1966)的实验，分泌性 IgA 经 6 *M* 胍处理后就可以解离出"SP"。因此，"SP"和 IgA 之间可能是以非共价键接合的。可是，另一些研究工作表明只有约 20% "SP"是以非共价键结合的，而大部分"SP"是由二硫键结合的（Tomasi 和 Czerwinski，1968)。当把 ^{131}I-"SP"加入到全血清中或几类免疫球蛋白混合物中后，做放射免疫电泳发现标记的"SP"可以和 IgA 专一地结合，而不与 IgG 和 Ig M 结合*。也就是说，这种结合具有免疫球蛋白类别的专一性。因此推测"SP"和 Ig A 的结合应在 α 链的 Fc 部位。每一个分泌性 IgA 分子所含"SP"分子数还没有精确测定，可能每一个 Ig A 双体中，含有一个"SP"。

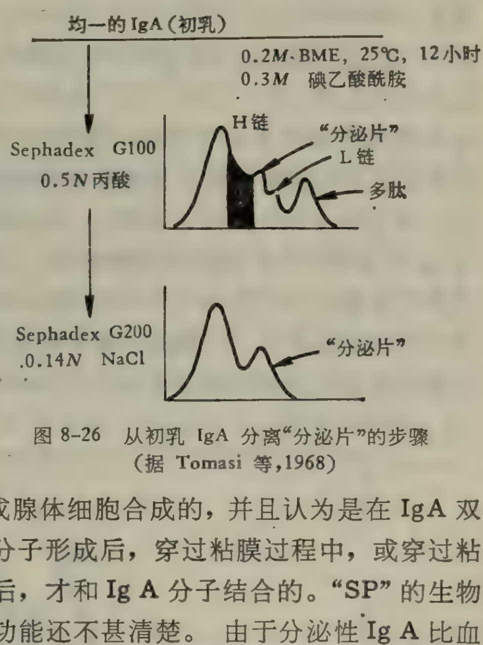


图 8-26 从初乳 IgA 分离"分泌片"的步骤
(据 Tomasi 等,1968)

"SP"和 Ig A 的来源不同，是由粘膜上皮或腺体细胞合成的，并且认为是在 IgA 双体分子形成后，穿过粘膜过程中，或穿过粘膜后，才和 Ig A 分子结合的。"SP"的生物学功能还不甚清楚。由于分泌性 Ig A 比血清 Ig A 更能抵抗蛋白酶的分解，因此推测"SP"可能使 Ig A (11S) 保持稳定，这种稳定性在处于消化道等富含蛋白酶的环境中尤其是必要的。没有足够的证据说明"SP"有利于 Ig A 穿过粘膜。

表 8-6 "分泌片"的理化性质

沉降常数	4.2S
分子量	58,000
糖(%)	9.5
二硫键克分子数/克分子	5

5. "J" 链的功能及其在多聚体 IgA 上连接的位置

如前节所述，"J"链最先是在家兔分泌性 Ig A 发现的（Hapern 和 Kosland,

* 近来发现分泌性 IgM 分子内也含有"分泌片"，见前节，第 233 页。

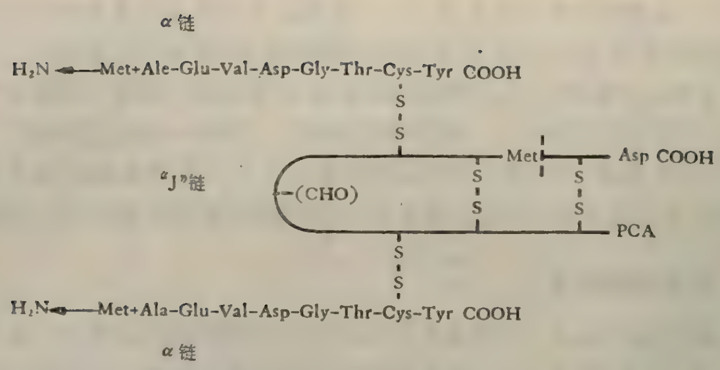


图 8-27 "J" 链在α链上连接的位置。虚线示 CNBr 切断的地点(据 Mestecky 等,1974)。

1970)。由于它只在多聚体分子中存在，而不在单体内存在,故假定其功能与亚基的连接有关系。然而，最近有人对这一点提出怀疑。因为有人发现单株多聚体 Ig M，并不含"J"链（Eskeland 和 Brandtzaeg，1974），而且缺少"J"链的 IgMs 亚基仍旧能重新聚合（Kownatzki，1972）。另一方面，还发现"J"链和上皮细胞产生的"分泌片"有亲合力。因此，这些学者主张"J"链并非 Ig A 和 Ig M 聚合所必需,而可能是和这些多聚体抗体的分泌有关系。近来，还用免疫萤光组织化学法，发现分泌 Ig D，Ig G，Ig M 和 Ig A 等所有各类 B 淋巴球在一定时期内都有"J"链存在。这似乎表明"J" 链是各类 B 淋巴球共有的基本产物，只是在细胞株增生的晚期，在产生 Ig M 和 Ig A 以外的细胞内，其合成才受到抑制。同时，可以假定在产生 Ig M 和 Ig A 的 B 淋巴球表面有 Ig M 或 Ig A 双体和"J" 链的复合物存在。当这些细胞和产生分泌片的上皮细胞、或游离的分泌片接触时，就会发生专一的结合，从而受到刺激在该处停留下来，并开始增生。总之，这些学者主张"J" 链的功能除假定可能和 Ig M，Ig A 的分泌有关系外，还可能和粘膜局部免疫系统的发育有关系（Brandtzaeg，1974）。

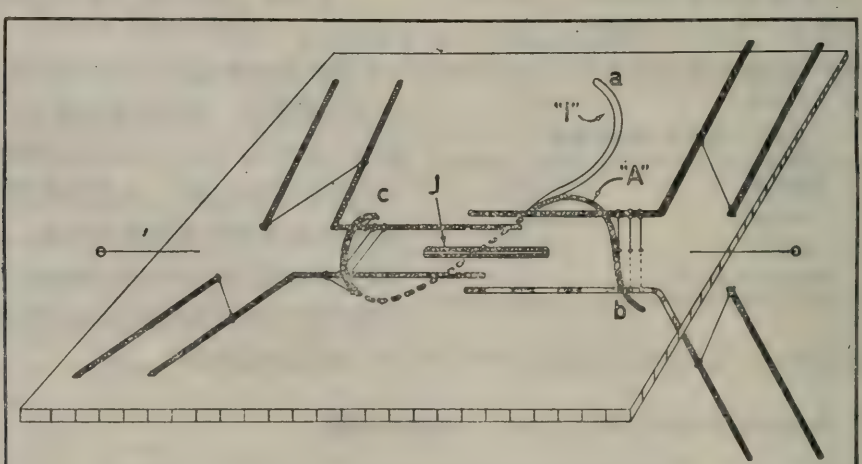


图 8-28 分泌性 IgA 的构造模型。J 为 "J" 链； C 为 "SP" 分泌片,缠绕在 IgA 二聚体的 Fc 表面(据 Heremans，1974)。

人多聚体Ig A髓细胞瘤蛋白经CNBr处理后可分离出一个含"J"链的片段。这一片段经过还原和烷基化以后，又可分离成三个成分：最大的成分(分子量=13,400)相当于"J"链的N端部分，含有一个高丝氨酸残基；第二个成分，相当于"J"链的C端部分，包括13—18残基；第三个成分是α链末端的8肽。这些材料表明"J"链是经过α链C端倒数第2位置的Cys.和α链相连接的(Mestecky 等，1974)(图8-27)。

最后，还应提到分泌性Ig A的结构模型问题。根据电子显微镜观察，以及"SP"和"J"链的资料，Hermans (1974) 提出了分泌性 $(Ig\ A)_2$-J-SP 的一个新的结构模型(图8-28)。在Ig A双体中，"J"链通过二硫桥和α链连接，并处于分子内部隐蔽的位置。分泌链("SP")假定是盘绕在Ig A双体Fc的表面，从一个单体的"铰链区"伸到另一单体的"铰链区"。当分泌链从a位置盘绕到b位置时，其构象发生变化，抗原决定簇"I"部分地失效。

小　　结

1. 动物体除循环抗体外，还存在局部免疫防御系统。在呼吸道、肠道等的局部免疫中，分泌性Ig A起着主要作用。这些抗体是由于抗原和粘膜接触后，由局部的大量浆细胞合成的。

2. 分泌性Ig A和血清IgA的化学结构不同，前者为含有"分泌片"和"J"链的二聚体。分泌性Ig A由于其独特的化学结构，不易被酶解，因而在富含蛋白酶的外分泌液的环境中仍能起抗体的作用。

3. 由于Ig A及其特殊的免疫学功能的发现，局部免疫的重要性愈益受到重视。国外在人体的研究证明病毒性上呼吸道感染的痊愈过程和鼻咽道分泌物内抗体的增加有密切的关系，而和血清抗体无显著的关联。利用局部预防免疫来预防上呼吸道感染(如流感疫苗)的研究在国外已取得进展。至今霍乱疫苗还是采用全身注射方式，在疾病预防上并不最有效。因此，有人建议改用肠道局部免疫的方式，以期取得更好的预防效果。此外，通过雌性生殖道局部免疫来控制生育的试探性研究也有人开始进行 (Tomasi, 1973)。

参　考　资　料

免疫球蛋白M

Brandtzaeg, P. (1975). Human secretory immunoglobulin M. An immunochemical and immunohistochemical study. *Immunol.* **29**, 559.

Capra, J. D. (1971). Hypervariable region of human immunoglobulin heavy chains. *Nature New Biol.* **230**, 61.

Chapuis, R. M., and Koshland, M. E. (1974). Mechanism of IgM polymerization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 657.

Conradie, J. D., and Visser, L. (1973). Normal IgM. II. The molecular weights of the intact molecule and its tryptic and reductive fragments. *Immunochemistry* **10**, 689.

Conradie, J. D., and Bubb, M. O. (1977). $C\mu_4$ domain of IgM has cytophilic activity for human lymphocytes. *Nature* **265**, 160.

Cunningham, B. A., Pflumn, M. N., Rutishausser, U. and Edelman, G. M. (1969). Subgroups of amino acid sequences in the variable regions of immunoglobulin heavy chains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **64**, 997.

Edberg, S. C., Bronson, P. M. and van Oss, C. J. (1972). The valency of IgM and IgG rabbit anti-dextran antibody as a function of size of the dextran molecule. *Immunochemistry* **9**, 273.

Eskland, T. and Brandtzaeg, P. (1974). Does J chain mediate the combination of 19S IgM and dimeric IgA with the secretory component rather than being necessary for their polymerization? *Immunochemistry* **11**, 161.

Dorrington, K. J. and Mihaesco, C. (1970). Subunit structure of human γ M-globulins. *Immunochemistry* **7**, 651.

Feinstein, A. and Munn, E. A. (1969). Conformation of the free and antigon bound IgM antibody molecules *Nature* **224**, 1307.

Feinstein, A., Munn, E. A. and Richardson, N. E. (1971). The threedlimensional conformation of γM and γA globulin molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 104.

Feinstein, A. (1974). Conclusions: An IgM model. Progress in Immunol. II., Vol. 1. Immunochemical aspect, p. 115.

Hurst, M. M. and Bennett, L. C. (1972). Characterization of five glycopeptides in a Waldenström IgM. *Fed. Proc.* **31**, 756. (Abstr).

Köhler, H., Shimizu, A., Paul, C. and Putnam, F. W. (1970). Macroglobulin structure. Variable sequence of light and heavy chains. *Science* **169**. 56.

Köhler, H., Shimizu, A., Paul C,. Moore, V., and Putnam, F. W. (1970). Three variable gene pools common to IgM, IgG, IgA immunoglobulins. *Nature* **227**, 1318.

Koshland, M. E. (1975). Structure and function of the J chain. *Adv. Immunol.* **20**, 41.

Merler, E. (1970). Immunoglobulin, M. In: ''Immunoglobulin'', p. 107.

Mestecky, J., Zikan. J. and Butter. W. T. (1971).Immunoglobulin M and secretory IgA. Presence of a common polypetide chain different from light chains. *Science* **171**, 1163.

Mestecky,, J. and Scharohenloher, R. (1974). Site of attachment of J chain to human immunoglobulin M. *Nature* **249**. 650.

Metzger, H. (1970). Structure and function of γ M macroglobulins. Advances in Immunol. 12, 57.

Morrison, S. L. and Kosland, M. E. (1972). Characterization of the J chain from polymeric Igs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**, 124.

Niedermier, W., et al. (1972). The localization of oligosaccharides in a human IgM protein. *J. Imm.* **108**, 346.

van Oss. C. J., Edberg, S. C. and Bronson. P. M. (1973). Valency of IgM. In: ''Specific receptors of antibodies, antigens and cells'', 3rd Int. Convoc. Immunol., p. 60.

Plaut, A. J. and Tomasi. T. B. (1970). Immunoglobulin, M. Pentameric Fcμ fragments released by trypsin at high temperatures. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **65**, 318

Putnam, F. W., Shimizu, A., Paul, C., Shinoda, T., and Köler. H. (1971). The amino acid sequence of human macroglobulin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**. 83.

Putnam, F. W., Shimizu, A., Paul, C. and Shinoda. T. (1972). Variation and homology in immunoglobulin heavy chains. *Fed. Proc.* **31**, 193.

Putnam, F. W., Florent, G., Paul, C., Shinoda, T. and Shimizu, A. (1973). Complete amino acid sequence of the Mu heavy chain of a human IgM immunoglobulin. *Science* **182**, 287.

Putnam, F. W., Shinoda, T., Shimizu, A., Paul, C., Florent, G. and Raff, E. (1973). Salient structural features of human IgM immunoglobulins. In: ''Specific receptors of antibodies, antigens and cells'', 3rd Int. Convoc. Immunol. Karger, Basel, p. 40.

Shimizu, A., Putnam, F. W., Paul, C., Clamp, J. R. and Johnson, S. (1971). Structure and role of the five glycopeptides of human IgM immunoglobulins. *Nature New Biol.* **231**, 73.

Shimizu, A., Paul, C., Kölcr. H., Shinoda, T. and Pintnam. F. W. (1971). Variation and homology in the μ-and γ-heavy chains of human immunoglobulins. *Science* **173**, 629.

Sterzl, J., et al. (1970). Detection of natural IgM subunits and subunits produced by reduction and alkylation by antisera. *Immunochemistry* **7**, 437.

Svehag, S. E., Chesebro, B. and Bloth, B. (1967). Ultrastructure of gamma-M immunoglobulin and alpha macroglobulin: electron-microscopic study. *Science* **158**, 933.

Svehag. S. E., Chesebro, B. and Bloth, B. (1937). Electron microscopy of virus-IgM antibody complexes and free IgM immunoglobulins; In ''Gamma-globulins structure and control of synthesis'', 3rd Nobel Symp., p. 269.

Svehag, S. E., Bloth, B. and Seligmann, M. (1969). Ultrastructure of papain and pepsin digestion fragments of human IgM globulins. *J. Exp. Med.* **130** 691.

Tomasi, T. B. (1973). Production of a noncovalently bonded pentamer of IgM: relationship to J chain.

Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.) **70**, 3410.
Wikler, M and Putnam, F. W. (1970). Amino acid sequence of human μ chains. III. Trptic peptides, chemotrptic peptides and sequence of protein. *J. B. C.* **245**, 4488.
Zagyansky, Y. A., Tumerman, L. A. and Egorov, A. M. (1972). Segmental flexibility of IgM molecules. *Immunochemistry* **9**, 91.

免疫球蛋白 A

Abel, C. A. and Grey, H. M. (1971). Structural differences in the hinge regions of human gamma A myeloma proteins of different subclasses. *Nature* **233**, 29.
Brandtzaeg, P. (1974). Presence of J chain in human immunocgytes containing various immunoglobulin classes *Nature* **252**, 418.
Boackle. R. J., Pruitt. K. M. & Mestecky, J. (1974). The interactions of human complement with interfacially aggregated preparations of human secretoryy IgA. *Immunochem.* **11**, 543.
Dourmashkin, R. R., Virella, G. and Parkhouse, R. M. (1971). Electron microscopy of human and mouse myeloma serum IgA. *J. Mol. Biol.* **56**, 207.
Frangione, B. Prelli. F., Mihaesco, C., Wolfenstein, C., Mihaesco, E. and Franklin, E. C. (1971). Structural studies of immunoglobulin G, M. and A heavy chains. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 71.
Francis. S. H., Graham R., Leslie, Q., Hood, L. and Eisen, H. N. (1974). Amino acid sequence of the variable region of the heavy (alpha) chain of a mouse myeloma protein with anti-hapten activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **71**, 1123.
Green. N. M., et al. (1971). Electron microscopy of complexes between IgA (MoPC315) and a bifunctional hapten. *J. Mol. Biol.* **56**, 203.
Grey, H. M., Abel, C. A. and Zimmerman, B. (1971). Structure of IgA proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 37.
Halpern. M. S. and Koshland, M. E. (1970). Novel subunit in secretory IgA. *Nature* **228**, 1276.
Heremans. J. F. (1970). Biochemical features and biologic significance of immunoglobulin A. In: "Immunoglobulins", ed. by E. Merler, Nat. Acad. Sci., Washington, D. C., p. 52.
Heremans, J. F. (1974). The IgA system in connection with local and systemic immunity. In: "The Immunoglobulin A System", ed. J. Mestecky and A. R. Lawton, Plenum Press., p. 3.
Kownatzki, E. (1972). Reassociation of IgM subunits in the presence and absence of forth component (J chain).
Jean-Pierre, Despont, J., and Abel, C. A. (1974). Glycopeptides of heavy chains from human IgA myeloma proteins. *J. Immunol.* **112**, 1623.
Lida, K., Fujita. T., Inai, S., Sasaki M., Kato T. and Kobayashi, K. (1976). Complement fixing abilities of IgA myeloma proteins and their fragments: The activation of complement through the classical pathway. *Immunochemistry* **13**, 747.
Liu, Y-S. V., Low, T. L. K., Infante, A. and Putnam, F. W. (1976). Complete covalent structure of a human IgA_1 immunoglobulin. *Science* **193**, 1017.
Low. T. L. K. Liu, Y-S. V. and Putnam, F. W. (1976). Structure, function, and evolutionary relationships of Fc domains of human immunoglobulin A, G. M. and E. *Science* **191**, 390.
Meinke, G. C. and Spiegelberg, H. (1972). Structural studies of human J chain. *Fed. Proc.* **31**, 755.
Mestecky, J., Zikan, J. and Butler, W. T. (1971). Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: Presence of a common polpeptide chain different from light chains. *Science* **171**, 1163.
Mestecky, J., Schrohenloher. R. E., Kulhavy. R., Wright, J P. and Tomana, M. (1974). Site of J chain attachment to human polymeric IgA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 544.
Nash, D. R. and Heremans, J. F. (1972). Intestinal mucosa as a source of serum IgA in the rat. *Immunochemistry* **9**, 461.
Munn, E. A., Feinstein, A. and Munro, A. J. (1971). Electron microscope examination of free IgA molecules and of their comlexes with antigen *Nature* **231**, 527.
Okada, Y., Nozu, Y., Titani K., Watanabe. S. Hara, H. and Kitagawa, M. (1972). Amino acid sequence of λ chain of human IgA. *Immunochem.* **9**, 207.
Parkhouse, R. M. E. (1972). Biosynthesis of J-chain in mouse IgA and IgM. *Nature New Biol.* **61**, **9**.
Prahl, J. M., Abel, C. A. and Grey, H. M. (1971). The carboxyl-terminal structure of the alpha-chain of human IgA myeloma proteins. *Biochemistry* **10**, 1808.
Svehag, S. E. and Bloth, B. (1970). Ultrastructure of secretory and high polymer serum IgA of human

and rabbit origin. *Science* **168** 847.

Sell, S. (1967). Isolation and characterization of rabbit colestral IgA. *Immunochem*, **4**, 49.

Skvaral, F. and Brummelova, V. (1965). Isolation of γ_1 A-globulin from the ethanol fraction III of plancenta serum. *Collect. Czechosl. Chem. Communs.* **30**, 2886.

Terry, L. M., Kunkel, H. G. and Grey, H. M. (1970). Absence of disulphide bonds linking the heavy and light chains: A property of a genetic variant of γ A2 globulins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **65**, 557.

Tomana, M., et al. (1972). The carbohydrate composition of human myeloma IgA. *Immunochem.* **9**, 933.

Tomasi, T. B. and Zigelman, S. (1963). The selective occurence of gamma-1A globulins in certain body fluids.*J. Clin. Invest.* **42**, 1552.

Tomasi, T. B. and Bienenstock, J. (1968). Secretory immunoglobulins. *Adv. Immunol*, **9**, 2.

Tomasi, T. B. and De Coteau, E. (1970). Mucosal antibodies in respiratory and gastrointestinal disease. *Ady. Internal Med.* **16**. **401**.

Tomasi, T. B., Kang, Y. S. and Calvanico, N. (1973). Special structure features of IgA. In: ''Specific receptors of antibodies, antigens and cells'', 3rd Int. Convocation on Immunol., p. 32.

Tomasi, T. B. (1973). The gamma A globulins: First line of defence. In: ''Immunobiology'', chap. 8, p. 76.

Tomasi, T. B. (1976). The immune system of secretions. Prentice-Hall Inc.

Wood, S. and Clem, L. W. (1974). The use of cholera toxin for obtaining rabbit secretory immunoglobulins. *J. Immunol. Methods* **4**, 207.

Zagyansky, Yu. A. and Gavrilova, E. M. (1974). Segmental flexibility of human myeloma immunoglobulins A. *Immunochem.* **11**, 681.

Zschocke, R. H., Grieble, H. G., Back, G. L. and Anderson, T. O. (1969). Studies on IgA. I. Fractionation procedure for isolation of IgA from pooled normal human plasma. *J. Immunol.* **102**, 625.

第九章　反应素抗体：IgE

某些变态反应病人(异位性过敏疾病，如植物花粉引起的枯草热和哮喘等)的血清中存在称为反应素（Reagin）的一类独特的抗体。反应素最显著的特性是对人的皮肤有很强的亲合力，皮肤的被动致敏状态至少可以维持3—6周，甚至数月之久。可是早期的研究发现这类抗体具有同种细胞亲合抗体的性质，只能使人或几种猴子的组织致敏，而不能使其他动物(如豚鼠)的组织致敏。反应素也不能和同型的抗原起沉淀反应。因此，直到不久以前对于反应素的测定仍然只能采用 Prausnitz-Kustner 反应（简称P-K反应)，即将欲测定反应素的病人血清注射到正常人皮肤内，经过24—48小时后，将变应原注射同一部位，10—15分钟内出现红斑为阳性反应。

对于反应素的化学性质，很长时期都不清楚。一直到1967年 Ishizaka 和 Ishizaka 才证明人类的反应素是属于一类新的免疫球蛋白，称为Ig E。后来，在猴、家兔、大鼠等实验动物也相继发现类似人类Ig E的抗体（Ishizaka 等，1969；1970；Isersky 等，1974)；这些抗体也具有同种细胞亲合抗体的性质。同时，它们的理化性质，对热和SH试剂的不稳定性，皮试的最适潜伏期都和人的反应素Ig E类似，而和某些动物中存在的另一类同种细胞亲合抗体（Ig G_1） 有明显的不同(表9-1)，因而可以认为是相当于人的Ig E。

表9-1　同种细胞亲合抗体的性质

性　质	I　型			II 型						
	豚鼠	小鼠	大鼠	人	猴	犬	家兔	豚鼠	大鼠	小鼠
沉降常数	7	7	7	8.0	8	8	8	8[a]	8[a]	8[a]
热不稳定性	±	±	−	+	+	+	±	+	+	+
SH 不稳定性	±	±	−	+	(+)	+	+	+	+	+
最适潜伏期	2-4小时	1-2小时	3小时	1-2天	1-2天	2天	3天	6天	3天	3天
免疫球蛋白类别	IgG_1	IgG_1	IgG_a	IgE	IgE		IgE		IgE	

a. 凝胶过滤法估计。
(据 K. Ishizaka 和 T. Ishizaka, 1971)。

(一) IgE 及其反应素抗体活力的发现

1. IgE 的发现

Ishizaka 等（1966）发现豕草过敏病人血清，经层析分离的反应素含量高的部分(Fr III)，经过抗已知各类免疫球蛋白（Ig A，Ig G，Ig D，Ig M）的抗血清吸收后，反应素抗体活力并不降低。此外，还证明它和Ig G的各亚类也没有关系。因此，假定人的

反应素抗体可能是一类新的免疫球蛋白。为了验证这一假定，他们用这一血清部分（Fr III）去免疫家兔，得到的抗血清用IgG，IgM，IgA，IgD 的髓细胞瘤蛋白吸收。经过这样吸收的抗血清(抗-Fr III) 与豕草过敏病人血清的反应素含量高的部分（Fr III）能专一地产生沉淀线，其电泳迁移率相当于 γ_1 球蛋白。这一发现表明可能存在一类在抗原性上和其他四类免疫球蛋白都不同的新的免疫球蛋白，暂时命名为 γE 球蛋白（即IgE)。另一方面，还排除了 IgG，IgM，IgA，IgD 是反应素的可能性（Ishizaka 和 Ishizaka，1966)。相隔不久，又有人发现一种髓细胞瘤蛋白质（ND）是 Ig E（Johanson 和 Bennich，1967；Ogawa 等，1969)。

2. 反应素抗体是 IgE 的证明

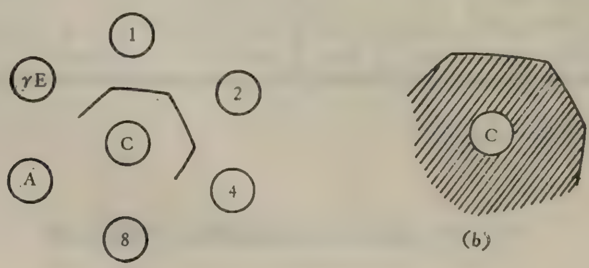
上述实验证明了豕草过敏病人血清之反应素含量高的部分内，确实存在一类新的免疫球蛋白（Ig E)。另一方面，还需要进一步证明这种新的免疫球蛋白（Ig E）本身就是反应素抗体。这主要有下述几方面的证据：

1）放射免疫扩散法发现反应素抗体和分离的 Ig E 抗体是相关连的。由于反应素抗体和变应原不能产生沉淀线，因此采取间接显示的方法(参看第十一章 328 页)，即将 ^{131}I 标记的豕草变应原和抗-FrIII（对 γE 球蛋白专一的）抗血清的混合物放人中央孔，对从豕草过敏病人血清（U）分离的含 γE 球蛋白部分（Ig E)，以及含有同一专一性的，稀释不同倍数的血清（P）起反应，结果发现只有 γE 和抗-Fr III 产生的一条沉淀线，以及专一性和它相同的沉淀线有放射性(即与标记的豕草变应原结合)（图 9-1)。因此，γE 球蛋白（IgE）具有对豕草变应原的抗体活力，并且同一专一性的反应素抗体和分离的 IgE 抗体是相关连的（Ishizaka 等，1966)。

2）豕草过敏病人血清的 P-K 反应效价和豕草专一的 IgE 抗体的浓度有平行关系。然而，和同一病人血清中 IgG，IgA，或 IgM 的抗体浓度无关系（Ishizaka 等，1967)。

3）反应素抗体和 IgE 抗体的理化性质相同。异位过敏性病人的血清，用离子交换层析、凝胶过滤、蔗糖密度梯度离心，以及凝胶电泳等方法分离时，反应素抗体活力的分布是和 IgE 一致的。

4）反应素抗体就是 IgE 的最主要证据，是从一移异位性过敏病人血清提纯的 Ig E



(a) (b)

图 9-1 放射免疫扩散实验。（a）染色。（b）相对应的放射自显影图形。中央孔（c)：豕草抗原(^{131}I 标记)与抗 FrIII 的混合物；（γE）从豕草过敏病人血清（U）分离之含 γE 的部分；（1，2，4，8）不同稀释倍数之豕草过敏病人血清(P)，含反应素抗体；（A)经过抗 FrIII 吸附之豕草过敏病人血清。比较（a)，(b）两图可见，只有专一性和 γE-抗 FrIII 沉淀带相同的带表现放射性(据 Ishisaka 等，1966)。

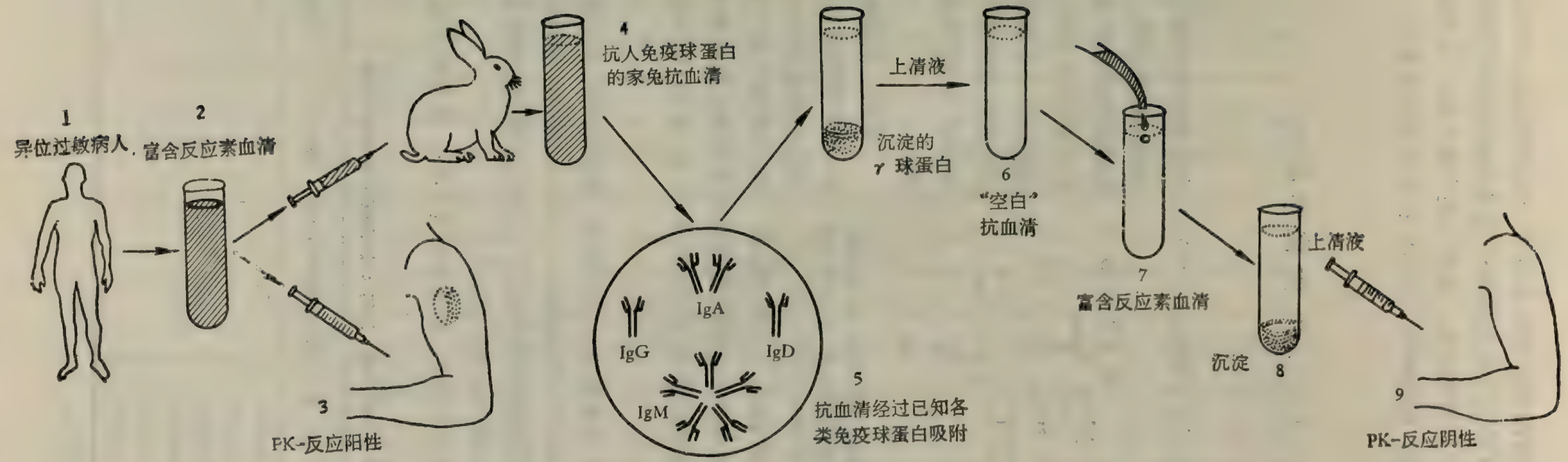


图 9-2　反应素抗体属于一类新的免疫球蛋白IgE的证明。从异位性过敏病人(1)取富含反应素的血清(2)，注射到正常人臂部引起PK 阳性反应(3)。将富含反应素血清输到家兔，使产生抗人免疫球蛋白的抗血清(4)。用已知各类免疫球蛋白吸收此抗血清，结果上清液内应没有抗 γ球蛋白抗体或“空白”(6)。然后加小量富含反应素血清到所谓“空白”抗血清内(7)，超离心去除新产生的沉淀(8)。上清液注射到正常人臂部，不出现 PK-反应，表明在其他几类抗体去除后，新加的具有反应素活力的抗体本身也被沉淀了，于是抗血清真正没有免疫球蛋白活力了(据 Ishizaka, 1973)。

能引起P-K反应，并且这种活力能被Ig E的专一抗体所去除（Ishizaka 和 Ishizaka，1967）。这些实验在另外20种以上的变应原-反应素系统（包括豕草花粉、住宅灰尘、马皮屑、青霉素以及卵白蛋白等）也得到证实。根据上述大量证据，人类的反应素抗体是IgE的看法，目前已被普遍接受。Ishizaka（1973）把反应素抗体属于一类新的免疫球蛋白的证明总结于图9-2。

（二）IgE的化学构造

1. 抗原性

用放射免疫电泳法证明了反应素抗体（γE）具有其他类别和亚类的免疫球蛋白所没有的抗原决定簇。同时，还具有和其他类别的免疫球蛋白相同的轻链（κ或λ链）的决定簇。这些证据表明γE（Ig E）是一类新的免疫球蛋白，是由和其他免疫球蛋白相同的轻链和独特的重链（ε链）构成的（Ishizaka 等，1967）。

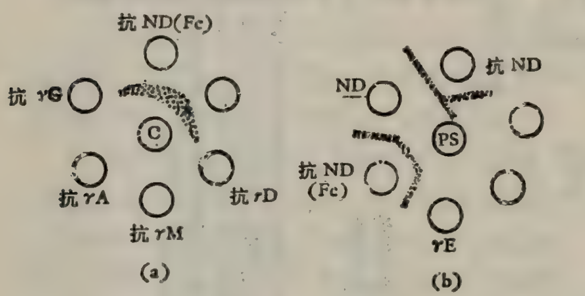


图9-3 放射免疫扩散，示髓细胞瘤蛋白质（ND）和γE(IgE)有相同的抗原性 C为反应素抗体含量高的血清 PS为另一种髓细胞瘤蛋白质（据 Merler，1970）

其次，抗髓细胞瘤蛋白质（ND）的Fc片段的抗血清能和抗γE（IgE）的抗血清沉淀同一抗原（图9-3a）。与此一致的是，髓细胞瘤蛋白质（ND）、γE（Ig E）和抗ND蛋白质之Fc的抗体产生相同的沉淀带（图9-3b）。这些结果证明髓细胞瘤蛋白质（ND）属于Ig E免疫球蛋白一类，并且IgE的类别专一的抗原决定簇是位于分子的Fc部分（Bennich 等，1969）。

2. IgE 的化学构造

由于正常人血清中IgE含量极少，分离困难，所有化学构造的研究都是用髓细胞瘤蛋白作材料进行的（Bennich 和 Johansson，1971）。然而，在已经得到专一的抗ε重链的抗血清后，就有可能用固相免疫吸附法，从正常人血清中比较简便地分离和纯化IgE了（Carrel 等，1971；Aalberse 等，1973）。

Ig E（ND）的分子量为196,000，沉降常数为7.9S，醣含量较高，达到10.71%，电

表9-2 IgE(ND)及其ε链、酶解片段的理化性质

	分子量	沉降常数(S20, W)	醣(%)	半胱氨酸	甲硫氨酸
IgE(ND)	196,000	7.9	10.71	42	18
L链（λ）(214氨基酸残基)	22,500	—	0	5	1
重链(ε)(ND)	75,500	—	14	16	8
F(ab′)₂	104,000	6.1	10.76	18	10
Fd′	29,500	—	19	4	4
1/2"Fc" = (重链-Fd′)	4,6000	—	11	12	4

（据 Bennich 和 Johansson，1968）。

1 Glp (Val,Glx) Leu-Val-Glx-Ser-Gly-Ala-Glx-Val-Arg-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Arg-Val-Ser-Cys-Lys(—

25 — —) Thr-Phe-Ile-Asp-Ser-Tyr- (Val-Gly-Trp-Ile-Arg-Glx-Ala-His-Gly-Gly-Leu-Glu-Trp) —

49 — —Ile-Asx-Pro-Asx-Ser-Gly-Gly-Thr-Asx-Tyr-Ala-Pro-Arg-Phe-Glx-Gly-Arg-Val-Thr-Met-Thr-Arg-

73 Asx-Ala-Ser-Phe-Ser-Thr-Ala-Tyr-Met-Asp-Leu-Arg-Ser-Leu-Arg-Ser-Asx-Asx-Ser-Ala-Val-Phe-Tyr-Cys-

97 Ala-Lys(Asx, Glx, Glx, Ser, Asx, Tyr, Glx, Gly, His, Gly, Gly, Val, Thr, Val, Ser, Thr, Gly, Ser, Thr, Thr, Gly, Pro,

121 Thr,Val,Phe) Pro-Leu-Thr-Arg-Cys-Cys-Lys-Asx-Ile-Pro-Ser-Asn-Ala-Thr-Ser-Val-Thr-Leu-Gly-Cys-Leu-

145 Ala-Thr-Gly-Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Met-Val-Thr-Trp-Asx-Thr-Gly-Ser-Leu-Asn-Gly-Thr-Thr-Leu-Pro-

169 Ala-Thr-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-Gly-His-Tyr-Ala-Thr-Ile-Ser-Leu-Leu-Thr-Val-Ser-Gly-Ala-Trp-Ala-Lys-

193 Gln-Met-Phe-Thr-Cys-Arg-Val-Ala-His-Thr-Pro-Ser-Ser-Thr-Asx-Asn-Val-Lys-Thr-Phe-Ser-Val-Cys-Ser-

217 Arg-Asx-Phe-Thr-Pro-Pro-Thr-Val-Lys-Ile-Leu-Glx-Ser-Ser-Cys-Asx-Gly-Leu-Gly-His-Phe-Pro-Pro-Thr-

241 Ile-Glx-Leu-Cys-Leu-Val-Ser-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gly-Thr-Ile-Asn-Ile-Thr-Trp-Leu-Glx-Asx-Gly-Glx-Val-

265 Met-Asp-Val-Asp-Leu-Ser-Thr-Ala-Ser-Thr-Glu-Ser-Glu-Gly-Glu-Leu-Ala-Ser-Thr-Glu-Ser-Glu-Leu-Thr-

289 Leu-Ser-Gln-Lys-His-Trp-Leu-Ser-Asp-Arg-Thr-Tyr-Thr-Cys-Glu-Val-Thr-Tyr-Glx-Gly-His-Thr-Phe-Glx-

313 Asx-Ser-Thr-Lys-Lys-Cys-Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg-Gly-Val-Ser-Ala-Tyr-Leu-Ser-Arg-Pro-Ser-Pro-Phe-

337 Asp-Leu-Phe-Ile-Arg-Lys-Ser-Pro-Thr-Ile-Thr-Cys-Leu-Val-Val-Asx-Leu-Ala-Pro-Ser-Lys-Gly-Thr-Val-

361 Asn-Leu-Thr-Trp-Ser-Arg-Ala-Ser-Gly-Lys-Pro-Val-Asx-His-Ser-Thr-Arg-Lys-Glu-Glu-Lys-Gln-Arg-Asn-

385 Gly-Thr-Leu-Thr-Val-Thr-Ser-Thr-Leu-Pro-Val-Gly-Thr-Arg-Asx-Trp-Ile-Glu-Gly-Glu-Thr-Tyr-Glx-Cys-

409 Arg-Val-Thr-His-Pro-His-Leu-Pro-Arg-Ala-Leu-Met-Arg-Ser-Thr-Thr-Lys-Thr-Ser-Gly-Pro-Arg-Ala-Ala-

433 Pro-Glu-Val-Tyr-Ala-Phe-Ala-Thr-Pro-Glu-Trp-Pro-Gly-Ser-Arg-Asp-Lys-Arg-Thr-Leu-Ala-Cys-Leu-Ile-

457 Gln-Asn-Phe-Met-Pro-Glu-Asp-Ile-Ser-Val-Gln-Trp-Leu-His-Asn-Glu-Val-Gln-Leu-Pro-Asp-Ala-Arg-His-

481 Ser-Thr-Thr-Gln-Pro-Arg-Lys-Thr-Lys-Gly-Ser-Gly-Phe-Phe-Val-Phe-Ser-Arg-Leu-Glu-Val-Thr-Arg-Ala-

505 Glu-Trp-Gln-Glu-Lys-Asp-Glu-Phe-Ile-Cys-Arg-Ala-Val-His-Glu-Ala-Ala-Ser-Pro-Ser-Gln-Thr-Val-Gln-

529 Arg-Ala-Val-Ser-Val-Asn-Pro-Gly-Lys

图 9-4 人IgE(ND) *ε* 链氨基酸排列顺序。存在封闭的N端，以及 9 和 23 位置为 Ala 和 Lys 都表示 V_{κ} 易变区可能和 V_{HI} 亚类有关系(据 Bennich 和 Bahr-Lindström, 1974)。

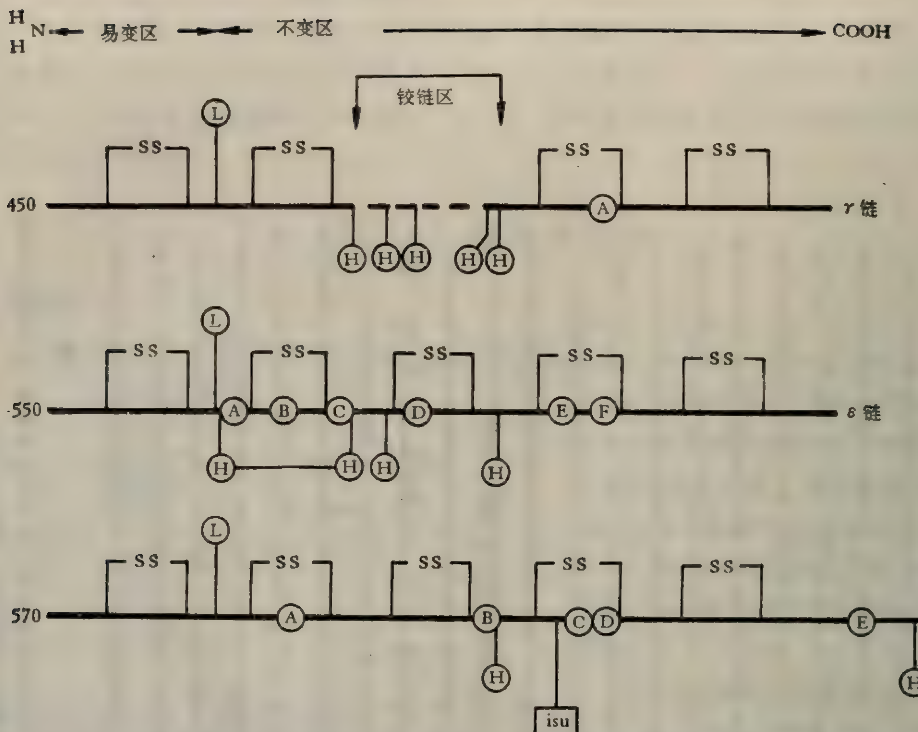


图 9-5 ε 链、γ 链和 μ 链构造的比较。示重链间二硫键、功能区和低聚糖单位 (A,B,C··· 等)的 位置。γ 链在"铰链区"缺少相当于 $C_ε^2$ 和 $C_μ^2$ 的功能区(据 Bennich 和 Bahr-Lindström, 1974)。

泳行为相当于 γ1。分子的基本构造是由两条相同的轻链（κ 或 λ 型）和两条特殊的重链（ε 链）组成的。木瓜酶处理时，分子被切断成 Fab 和 $Fc_ε$片段。类别专一的抗原决定簇位于 $Fc_ε$ 片段上。经胃蛋白酶切断成 F (ab)$_2$ 和 $Fc'_ε$。IgE 及其 ε 链、酶解片段的理化性质列于表 9-2。

1974 年已有人把 IgE (ND) 的 ε 重链的氨基酸排列顺序基本上弄清 楚 了（图 9-4）(Bennich 和 Bahr-Lindström，1974)。

ε 重链是由约 550 氨基酸残基构成的。根据链内二硫桥的分布位置和排列顺序的同源性，ε 重链可分为 5 个同源区(功能区)。 除易变区 ($V_ε$) 外， 还包括不变区的 4 个同源区 ($C_ε^1$，$C_ε^2$，$C_ε^3$ 和 $C_ε^4$)。 虽然易变区 ($V_ε$) 的排列顺序还有两段不清楚， 但是根 据 N 端是封闭的， 以及 9 和 23 位置是 Ala 和 Lys 等特点，表明 IgE (ND) 的 $V_ε$ 链可能属于 V_{HI} 亚类。这再一次支持重链易变区 (V_H) 的同源性和重链的类别无关， 而独立地进化的假说。

IgM 的 μ 重链也含有 5 个同源区。 和 μ 链比较，ε 链的显著区别是缺少 C 端的 19 肽 (图 9-5)。ε 链 (ND) 有 15 个半胱氨酸，其中 10 个形成功能区的链内二硫键。ε 链只有 3 个链间二硫键，一个连接重链和轻链，包括 Cys-128 (或 Cys-129)；另二个是 ε 链 彼此之间互相连接的，一个在 Cys-231 位置，另一个在 Cys-318 位置。剩余的两个半胱氨酸 Cys-129 (或 Cys-128) 和 Cys-215 构成 $C_ε^1$ 同源区之额外的一个链内二 硫 键。这种情况，即 C_H^1 功能区有两个链内二硫键，还见于家兔的 γ 链。 然而，两个重链间二

表 9-3 IgE(ND) ε 链的低聚糖组成及糖多肽的氨基酸排列顺序

糖多肽[b]	每克分子糖多肽的糖残基数目[a]				
	岩藻糖	甘露糖	半乳糖	N-乙酰氨基半乳糖	唾酸
135 A. -Ile-Pro-Ser-ASN-Ala-Thr-Ser-	1.3(1)	3.3(3)	2.5(2)	3.9(4)	0.5(1)
163 B. -Gly-Ser-Leu-ASN-Gly-Thr-Thr-	1.4(1)	3.8(4)	2.7(3)	5.0(5)	0.7(1)
208 C. -Ser-Thr-Asx-ASN-Val-Lys-Thr-	痕量	3.2(3)	2.6(2—3)	3.3(3)	2.3(2)
255 D. -Gly-Thr-Ile-ASN-Ile-Thr-Trp-	痕量	2.8(3)	2.2(2)	3.4(3)	1.4(1—2)
361 E. -Gly-Thr-Val-ASN-Leu-Thr-Trp-	0.6(1)	3.2(3)	2.0(2)	3.2(3)	1.4(1—2)
F. -Lys-Gln-Arg-ASN-Gly-Thr-Leu-	—	5.7(6)	0.3(0)	1.8(2)	—
	总和：2.3	19.1	12.3	20.6	6.3
每一条 ε 链的糖残基数[c]	2	18	8.5	18	9

a 转化为 TMS-衍生物，用气液相层析法测定； b 数字表示在图内的排列顺序； c 根据 Bennich, H.和Lohansson, S. G. O. (1971), Adv. Immunol.V. 13.
(据 Bennich 和 Bahr-Lindström, 1974)。

硫键位于"铰链区"不同的位置，一个位于 C_ε^1 和 C_ε^2 之间，另一个位于 C_ε^2 和 C_ε^3 之间，却是 ε 链独特的地方。

IgE (ND) 的醣含量很高。ε 链 (ND) 有 6 个低聚糖侧链：一个位于 V，C 之间(和 Asn-135 连接)，一个位于 C_ε^1 (和 Asn-163 连接)，一个位于"铰链区"(和 Asn-207 或 -208 连接)，一个位于 C_ε^2 (和 Asn-255 连接)，两个位于 C_ε^3 (和 Asn-361，Asn-384 连接)。它们的糖组成和糖多肽的氨基酸排列顺序列于表 9-3 (Bennich 和 Bahr-Lindström，1974)。和 IgM 的 μ 链相比较，它们的糖侧链没有明显的同源性。

根据酶解片段的研究，IgE 的细胞亲合性和 Fc 有关，而和 Fc″或 F(ab′)$_2$无关。这提示 IgE 的细胞亲合性可能和 C_ε^3 或 C_ε^4 功能区有关系(图 9-6)。已知反应素抗体的特点是 56°C热不稳定。现已知道，这只是由于 C_ε^3 和 C_ε^4 功能区发生不可逆变性的结果，而不是由于二硫键的改变。抗原性分析也发现，只有 D 2 抗原(限于 C_ε^3 和 C_ε^4 功能区) 在

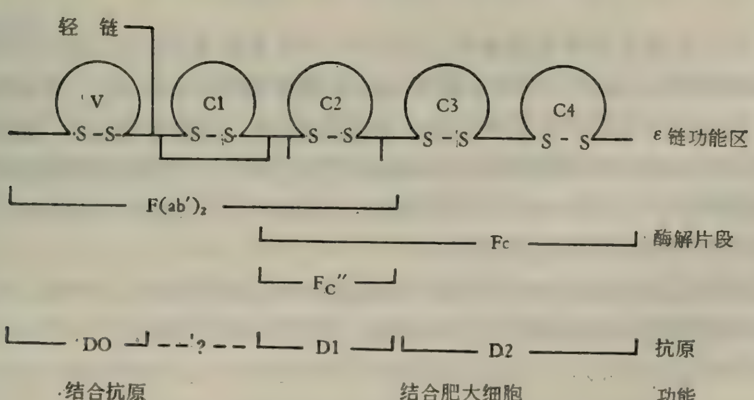


图 9-6 ε-链功能区的位置和酶解片段的关系(据 Bennich 和 Bahr-Lindström, 1974)。

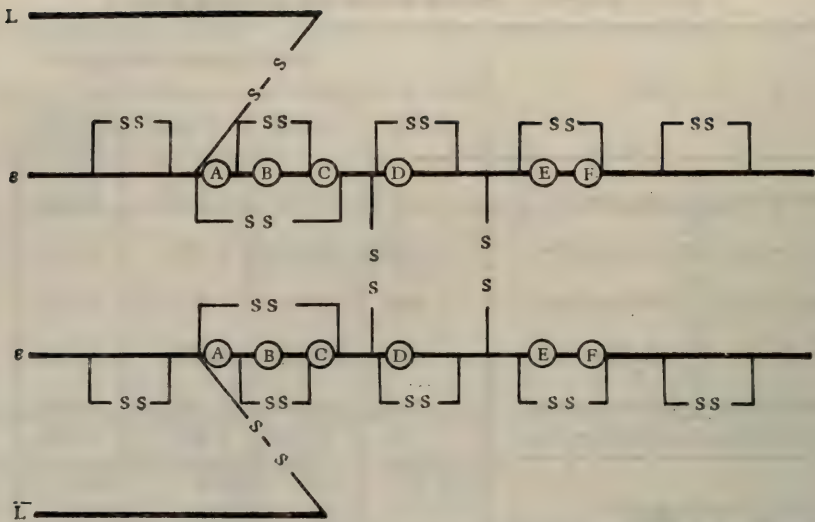


图 9-7 人 IgE（ND）的基本化学结构简图。 A，B，C…为低聚糖（据 Bennich 和 Bahr-Lindström 1974，改绘）。

56°C 时，其抗原性逐渐消失（Dorrington 和 Bennich，1973）。

根据上述资料 IgE 分子的基本结构推想如上图所示。

关于 IgE 分子在溶液中的物理性质，利用萤光偏振和电子自旋共振（ESR）两种方法，对另一个 IgE（Yu）髓细胞瘤蛋白研究的结果，发现 IgE 分子比 Ig G 分子的柔曲性要小得多（Nezlin 等，1973）。这提示 Ig E 的 Fab 之间可能有更多的键连接，或者可能和前述 IgE“铰链区”二硫键独特的排列方式有关系。如前所述，哺乳类 IgG，IgM 和 IgA 分子都有相当大的柔曲性，而 Ig E 和它们比较起来柔曲性要小得多。已知前几类抗体分子都能和抗原相互作用，形成沉淀；而 IgE 抗体则不能形成沉淀。因此，有理由认为这种功能上的差别可能和分子一般构造的柔曲性的差别有关系（Zagyansky 等，1974）。

（三）IgE 的含量、合成地点和代谢

正常成年人血清中 IgE 含量极少，约 100—200 毫微克/毫升。异位性过敏病人（哮喘、枯草热、湿疹等），血清中 IgE 含量平均比正常含量高 3—10 倍。感染蛔虫的病人，血清中 IgE 增加更为显著，可达到 4,400 毫微克/毫升，其他寄生虫病，如血吸虫、钩虫、丝虫等也发现有类似的升高现象（Johansson 等，1972）。已知 IgE 髓细胞瘤蛋白质的生物学半衰期很短，只有 2—3 天（Waldman，1969），而 IgG 可长达 25 天。因此，异位性过敏病人体内应不断地合成 Ig E。

利用萤光标记抗体法，研究了 IgE 形成细胞的组织学分布（Tada 和 Ishizaka，1970），观察到在重复感染的病人手术切除的扁桃腺和增殖腺内含 Ig E 的浆细胞数目最多（占细胞总数的 5—6%），位于滤泡周围和某些生发中心。气管和胸膜的淋巴结内也有这类细胞分布。与此相反，脾脏和皮下淋巴结内却很少。最值得注意的是 IgE 合成细胞是和 IgA 合成细胞相伴随的，在呼吸道、消化道粘膜以及这些部位的局部淋巴结内有大量

表 9-4 IgE 形成细胞在淋巴组织内的分布

淋巴组织	人		猴	
	浆细胞	生发中心	浆细胞	生发中心
扁桃腺	+～+++	+～++	+	++
增殖腺	+～+++	+～++		
气管				
胸膜	++	(+)	++	(+)
皮下淋巴结	±～+	−	±	−
脾	±～+	−	+～++	±
呼吸道粘膜	+	−	+	−
消化道粘膜	+～++	−	+～++	(+)
肺	−	−	−	
血	−	−	极微量	
骨髓	−	−	极微量	

分布(表 9-4)。这种分布情况说明 Ig E 抗体可能是在局部合成的，并参加引起这些器官的变态反应性疾病。

实际上，从哮喘病人鼻腔洗出液和痰中可测出 IgE (Ishizaka 和 Newcomb, 1970)。 利用抗 Ig E 免疫吸附剂从枯草热病人痰中提取出的 Ig E 表现出反应素抗体活力，以及高度的致敏皮肤的活力。所有这些事实表明，呼吸道之反应素抗体参与的过敏反应可能是变应原局部致敏的结果，局部形成的 IgE 抗体可能在这些器官的变态反应性疾病的发病过程中起主要的作用。

(四) IgE 的免疫学功能

1. 红血球凝集作用

对豕草过敏病人的 Ig E 抗体能使镀抗原的红血球被动凝集。根据 IgE 肽链组成，推想 IgE 可能是双价抗体 (Ishizaka 和 Ishizaka, 1968b)。

2. 固定补体问题

反应素超敏反应中，是否有补体参加作用，曾经是长期争论的问题。用一般方法不能测出 IgE 抗体有固定补体的能力。为了排除 Ig E 具有微弱的固定补体的可能性，特别研究了聚集的 IgE 髓细胞瘤蛋白的固定补体的能力，即使达到 800 微克 IgE 氮/毫升的剂量也无作用。聚集的 IgE 不能固定 C1a，也不能从纯化的 C3 形成过敏毒素 (Ishizaka 等, 1970)。因此，认为 Ig E 抗体引起的过敏反应可能没有补体参加。可是，最近发现聚集的 IgE 经过一条支路能固定补体的后几个成分 (C3—C9)，越过了 C1、C4 和C2，而单体 Ig E 则不能 (Ishizaka 等, 1972)。 这一问题还有待进一步研究解决。

3. 致敏同种组织

反应素抗体 (IgE) 最重要的免疫学特性是致敏同型组织的能力。例如对豕草过敏病

人血清的 IgE 抗体，使人皮肤致敏（P-K 反应阳性）的剂量为 4×10^{-5} 微克氮/毫升（Ishizaka 等，1967），而人的其他几类免疫球蛋白 IgG，IgM，IgA，IgD 都不能使人皮肤致敏。

4. PCA 反应

含 IgE 抗体的异位性过敏病人血清注射到猴子皮肤内能引起被动皮肤过敏反应（PCA 反应）。对一种猴子（*Macaca irus*）所需的最低有效剂量为 10^{-3} 微克氮/毫升。人 IgE 抗体对豚鼠不能引起 PCA 反应。后来，用逆 PCA 反应重新研究这一问题。豚鼠先皮内注射 IgE 髓细胞瘤蛋白质，3 小时后静脉注射抗-IgE 抗体，结果表明甚至 Ig E 浓度增加到 100 微克氮/毫升也无效。因此，人 IgE 只能使同种或血缘关系上邻近的种(猴类)的皮肤致敏，而不能使豚鼠皮肤致敏。

5. 致敏白血球

从异位性过敏病人分离的白血球接触到变应原时，就能释放出组织胺（Lichtenstein 和 Osler，1964）。含反应素血清还可以使正常白血球被动致敏，再和抗-Ig E 抗体接触时也能释放出组织胺。显然，在被动致敏过程中，IgE 附着到白血球上去了（图 9-8）（Ishizaka 等，1969）。这一发现支持变应原诱发白血球释放组织胺可能是和 IgE 有关系的。

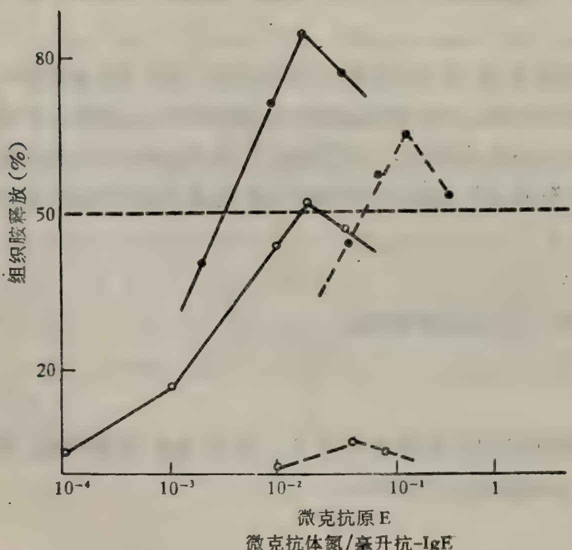


图 9-8 豕草变应原和抗 IgE 抗体引起反应素被动致敏的白血球释放组织胺 ○直接(抗原 E)，●逆反应（抗 IgE）(据 Ishizaka 和 Ishizaka，1971)。

6. 致敏猴肺组织

含反应素的血清在离体条件下能被动致敏猴肺组织，再与变应原接触就能诱发释放组织胺和慢性作用物质（SRS-A）[1]。血清经过抗IgE 免疫吸附剂吸附后就失去致敏活力。此时，血清中IgG，IgA，IgM的浓度未变。因此，这提示 IgE 参与变应原诱发的肺组织的组织胺和 SRS-A 的释放。鉴于这两种物质是引起人类哮喘的化学介质，上述观察有力地提示 IgE 抗体参与呼吸道变态反应的发病机制。

7. 致敏大鼠的肥大细胞

以往认为反应素抗体的特点是只能致敏同种组织，因而归并到同种亲合抗体。目前已经证明人的 IgE 反应素抗体，除了致敏同种组织外，还能够致敏大鼠腹腔内的或离体培养的肥大细胞，当再遇到同型抗原或抗 IgE 抗体时，便能引起细胞内嗜硷性颗粒的释

1) 1979 年始发现慢性作用物质(SRS)是一类在化学上与前列腺素相近的新化合物，称为白血球三烯（Leucotrienes)，它们可能参与过敏和炎症反应(参看：Science 215 卷，1380 页，1982)。

放（Krotzer 和 Haddad，1970；Orange 和 Austin，1973）。同样地，小鼠 Ig E 也能专一地和大鼠肥大细胞结合（Konig 等，1974）。因此，同种亲合性抗体的概念已不完全适用于 IgE 抗体，最好还是用反应素抗体一词为宜。

离体大鼠肥大细胞颗粒释放技术（Rat mast cell degranulation technicque，简称 RMCD 法）对于检查 IgE 抗体及其变应原，以及筛选抑制反应素过敏反应药物是一个很有用的方法（Krotzer 等，1971；Johansson 等，1972）。

（五）反应素过敏反应的分子细胞学机制

1. IgE 致敏细胞的机制

IgE 抗体的特性是使同种组织致敏的能力（后来发现对某些异种肥大细胞也能致敏）。这可能是由于 Ig E 对参与反应素过敏反应的靶细胞有特殊的亲合力。非抗体的 IgE 或 IgE 髓细胞瘤蛋白质都能封闭反应素抗体的被动致敏作用，而其他四类免疫球蛋白，则没有这种作用（Stanworth 等，1967；Ishizaka 等，1967c）。另一方面，抗 Ig E 抗血清能引起被动致敏的肥大细胞的“逆过敏反应”(“Reversed type” allergic seactions)，而对抗其他几类免疫球蛋白的抗血清都不能引起这种反应，也证明靶细胞表面确有 IgE 存在，而没有其他免疫球蛋白存在。

已证明 IgE 分子和靶细胞（如肥大细胞）表面受体亲合是通过 Fc_ε 实现的。IgE 髓细胞瘤蛋白质的 Fc_ε 片段能专一地封闭反应素抗体对人和猴皮肤的被动致敏反应，而其它的片段 Fab，$F(ab')_2$ 都不能（Stanworth 等，1968）。此外，在“逆过敏反应”实验里，Fc_ε 还能使人白血球，猴肺组织被动致敏（Ishizaka 等，1970）。猴肺组织经 1 微克/毫升的 Fc_ε 被动致敏后，再用抗 IgE 抗血清处理时，便能诱发组织胺和 SRS-A 的释放。以上这些事实表明 IgE 分子是通过 Fc_ε 部分和靶细胞表面受体结合的，并且 IgE 分子的效应器也应位于 Fc_ε 上。

随着 ε-链的一级结构的阐明，已有可能用按一定排列顺序合成的肽段来研究 IgE 亲合细胞功能的结构基础。有人合成了位于 ε-重链间二硫桥附近的一个 5 肽（320 至 324 位置）：Asp-Ser-Asp-Pro-Arg；并发现此 5 肽能专一地抑制 P-K 反应和已知的皮试阳性反应，而其他合成的结构类似物没有或只有较小的抑制能力(表 9-5)。因此，该作者认为这一五肽的排列顺序很可能代表和肥大细胞和嗜碱性细胞表面 Ig E 受体专一结合的主要抗原决定簇的构造（Hamburger，1976）。

用 ^{125}I 标记的抗 IgE 抗血清的放射自显影实验表明，IgE 对白血球的结合有高度的专一性，只和嗜碱性白血球结合。已知嗜碱性白血球内的嗜碱性颗粒含有大量与肝素蛋白质复合物结合的组织胺。当用 ^{125}I 标记的抗IgE 抗血清处理后，细胞学检查发现有放射径迹的嗜碱性白血球内的嗜碱性颗粒消失了。已知组织胺的释放依赖 Ca^{++}。如果用 EDTA 抑制组织胺释放，结果几乎所有 ^{125}I 标记的细胞都保留着嗜碱性颗粒。这些实验表明：IgE 能选择地结合在嗜碱性白血球上，当再和变应原或抗IgE 抗体相互作用时，便导致组织胺等化学介质的释放（Ishizaka 等，1970）。用同样的方法证明了猴皮肤、大网膜、小肠等组织内，IgE 的靶细胞是肥大细胞，并存在类似的释放机制。一般说来，各类细胞亲合抗体各有其细胞结合专一性。和 IgE 不同，IgG 只和嗜中性球和单核球

表 9-5 人工合成的肽段对 P-K 反应的抑制，示结构和功能的关系

肽段		平均抑制程度	
No.	排列顺序	%	范围
I	Asp-Pro-Arg	15	0—38
II	Ser-Asp-Pro-Arg	18	0—50
III	Asp-Ser-Asp-Pro-Arg	72	60—89
IV	Ala-Asp-Ser-Asp-Pro-Arg	46	10—61
V	Asp-Thr-Glu-Ala-Arg	58	38—80
VI	Tos-Arg-Ser-Met	24	0—40

（据 Hamburger, 1976）。

（巨噬细胞）结合，而不和嗜碱性白血球结合，因而引起不同的继发反应。这种免疫学功能的区别的基础又在于各类免疫球蛋白 Fc 结构的分化。

2. 反应素过敏反应的分子细胞学机制

为什么变应原或抗 IgE 抗体与结合在细胞表面上的 IgE 起反应时能引起反应素过敏反应呢？为了探讨这一问题，曾有人利用豚鼠抗 IgE 抗体的酶解片段处理经 IgE 致敏的细胞，发现双价的 $F(ab')_2$ 片段能引起嗜碱性球释放组织胺，而单价的 Fab′片段，即使浓度增加 100 倍也不能引起阳性反应（Ishizaka 等，1969）。对于被动致敏的猴肺组织，也得到同样的结果（Ishizaka 等，1970）。这些实验结果似乎提示诱发靶细胞的反应可能要求结合在细胞表面的两个 Ig E 分子之间"搭桥"。为了验证这一假说，进一步的实验发现非专一地聚集的 IgE 分子也能引起人和猴的皮肤反应，而 IgE 的单体，即使剂量增加1 00 倍仍然不能引起阳性反应（Ishizaka 等，1970）。此外，还发现聚集的Fc片段（0.1—0.3 毫微克氮）就能在正常人引起皮肤反应，而 Fc 单体 1 毫微克的剂量也不能引起反应。同样地，聚集的 Fc 或 IgE 都能引起正常人的白血球、猴肺组织释放组织胺和 SRS-A，而 Fc 单体或聚集的 IgE 的 $F(ab')_2$都无此作用。另一方面，用超离心法鉴别免疫复合物内抗原抗体的比例，也发现形成一个有致敏活力的复合物，至少必须有 2 个 IgE 分子。所有这些事实都支持上述的假说，即通过抗原的"搭桥"，使结合在靶细胞表面的两个 IgE 分子互相贴近而引起的分子间的相互作用或分子内构象的变化，是和靶细胞的化学介质的释放有关系的（图 9-9）。

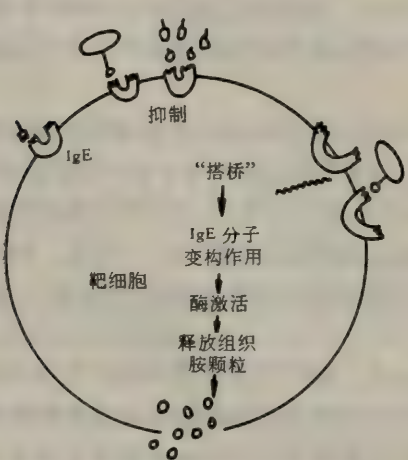


图 9-9 变应原引起靶细胞释放组织胺的分子机制。

另一方面，用 DNP 或 BPO 半抗原载体结合物免疫家兔，产生专一的反应素抗体。取其白血球，经洗涤后作体外组织胺释放实验，发现当免疫时仅含一种半抗原（DNP 或 BPO），只有相应的双价半抗原（Di-DNP 或 Di-BPO）才能引起白血球的释放反应，而

单价半抗原则能专一地抑制双价半抗原引起的释放反应。可是，混合双价半抗原(混合-BPO 和 DNP) 却和单价半抗原一样，也能抑制仅含一种半抗原 (BPO 或 DNP) 的结合物免疫的家兔白血球的释放反应。对于用两种半抗原 (DNP 和 BPO) 载体结合物同时免疫的家兔的白血球，混合双价半抗原(混合-BPO 和 DNP) 则能引起组织胺释放反应；并且两种半抗原 (DNP 或 BPO) 都能抑制组织胺释放反应。这些实验证明双价半抗原引起组织胺释放反应时，必须能使结合在膜上的两个抗体分子之间“搭桥” (Magro 和 Alexander，1974)。

根据这些实验结果，可以设想反应素过敏反应的分子细胞学机制是：在致敏状态下，IgE 抗体分子通过 Fc 能选择地和某些组织细胞的表面受体亲合。由于多价的抗原和这些固定在靶细胞表面的抗体结合，形成免疫复合物的结果，和同一多价抗原结合的IgE 抗体分子之间便可能发生相互作用，导致抗体 Fc 部分发生构象变化，从而触发细胞的释放机制。另一种可能的解释是多价抗原和细胞表面结合的 IgE 分子“搭桥”时，也就引起了细胞表面 $Fc_ε$ 受体的簇集和构象变化，从而触发细胞内的释放机制。近来，有人从肥大细胞和嗜碱性白血病细胞表面分离出 IgE 受体 (Conrad 等，1976)，并证明 IgE 受体和 $Fc_ε$ 是单价结合的 (Newman 等，1977)。这提示肥大细胞的释放机制很可能是在 IgE 分子“搭桥”时，引起细胞表面 $Fc_ε$ 受体的簇集或聚合而发动的。

3. 肥大细胞颗粒的释放和抑制

临床上很早就发现甲基黄嘌呤衍生物，如咖啡碱、茶叶碱 (Theophylline) 等，能减轻反应素过敏反应(如哮喘等)病人的症状。但过去对这些药物的作用原理不清楚。离体培养的人肺组织，尤其是离体大鼠肥大细胞颗粒释放技术 (RMCD) 的建立，提供了研究肥大细胞释放组织胺和 SRS-A 等化学介质的机制及其抑制的方便的模型，这方面的研究才得到较快的进展。在离体模型上进行的这些实验发现，凡是能刺激细胞膜腺嘌呤环化酶，促进C-AMP 合成的药物，如肾上腺素、isoprenaline、前列腺素 E_1、E_2 等以及能抑制C-AMP分解的药物，甲基黄嘌呤衍生物，如茶叶碱或氨茶碱等，都能抑制

表 9-6 药物处理对 IgE 抗 IgE 反应引起的肥大细胞颗粒释放的抑制影响

药 物	下列浓度对细胞颗粒释放的抑制百分率%:							
	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	$10^{-7}M$	$10^{-8}M$	$10^{-9}M$	$10^{-10}M$
Isoprenaline	85.2±6.16	74.2±4.67	21.0±7.48					
肾上腺素	80.4±4.24	72.0±3.06	19.3±2.16	15.0±3.2				
茶叶碱	87.5±4.50	78.8±4.78	72.5±1.88	13.6±6.88				
氨茶碱	68.5±16.2	12.8±3.20	10.0±1.63					
色甘酸钠	87.2±1.40	78.7±2.94	72.2±3.79	13.7±0.81				
Chlorphenesin	79.4±7.76	62.3±4.08	44.6±8.86	14.2±1.24				
前列腺素								
E_1					86.6±5.09	83.0±3.10	70.2±4.90	12.8±1.22
E_2					85.4±1.63	83.0±6.78	33.6±5.89	10.8±2.94

E_1，E_2 抑制效应在很低浓度 (10^{-8}—$10^{-9}M$) 起作用。
(据 Kimura 等，1974)。

肥大细胞颗粒的释放(表 9-6)。

此外，二丁基-C-AMP 本身也有这种抑制作用。总之,凡是能直接或间接地增加细胞内C-AMP 水平的药物都能产生这种效果。这些事实提示，在反应素抗体引起的肥大细胞和嗜碱性白血球的颗粒释放机制中,C-AMP 可能起关键作用(图 9-10)。C-AMP 能抑制 IgE 诱发的人皮肤过敏反应也支持这一看法 (Yamamoto 等，1972)。此外,增加细胞膜的稳定性的药物,如色甘酸钠 (Cromoglycate) 也能抑制这些细胞颗粒的释放 (Orange 和 Austin, 1973; Kimura 等，1974)。

以上这些发现对于合成和筛选抗过敏药物的意义是显而易见的。近来有人报告一种氧代黄嘌呤衍生物 (2-O-propoxyphenyl-8-azapurin-6-one) 在实验模型上抑制反应素过敏反应的能力比目前临床上治疗哮喘最有效的药物——色甘酸钠，还要强 20—50 倍，很可能有临床应用价值 (Brughton 等，1974)。

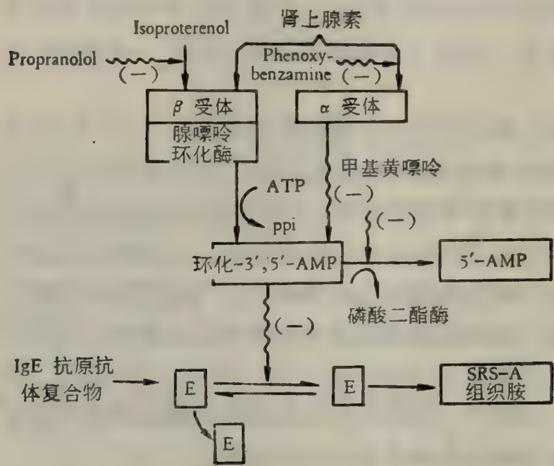


图 9-10 反应素抗体引起的肥大细胞化学介质的释放和抑制示意图。IgE 抗体和专一抗原的相互作用激发一系列酶促反应($E \rightleftharpoons \bar{E}$), 导致组织胺和 SRS-A 的释放。此反应系列受细胞内 C-AMP 水平调节。肾上腺素或 Isoproterenol 等刺激 β-受体的药物能激活细胞膜上的腺嘌呤环化酶,从而促进 C-AMP的合成,结果细胞内 C-AMP增加，抑制组织胺和 SRS-A 的释放。用 Phenoxybenzamine 抑制肾上腺素的刺激 α-受体的作用也可以加强肾上腺素的抑制作用。反之，用 Propranol 抑制肾上腺素的 β-受体刺激作用时,细胞内 C-AMP降低，结果化学介质的释放增加。C-AMP通常被磷酸二酯酶分解，当此酶的作用被甲基黄嘌呤类药物抑制时, C-AMP水平增加,化学介质的释放也受到抑制(仿 Orange 和 Austen, 1973)。

小结

1. 人的反应素抗体属于一类新的免疫球蛋白 IgE，其化学性质为一种 γ1-醣蛋白,分子量为 196,000。分子的基本构造含有两条相同的轻链 (λ 或 κ) 和两条特殊的重链(ε)。重链的一级结构已差不多弄清楚了。

2. IgE 在血清中的含量极低，在异位性过敏病人，尤其是寄生虫病病人血清中含量较高。IgE 的生物学半衰期只有 2—3 天。IgE 的合成地点可能主要是在呼吸道和消化道局部的淋巴组织。从呼吸道异位性过敏病人的痰内可检测出 IgE 抗体。这些事实表明局部形成的 IgE 抗体可能在哮喘等呼吸道异位性过敏反应的发病机制中起主要作用。

3. IgE 抗体能被动凝集红血球，因此可能是双价的。然而，IgE 用一般方法不能测出固定补体的能力。人 IgE 可使人和猴的皮肤致敏，但对豚鼠无作用。人的白血球、猴肺组织经 IgE 致敏后，与变应原或抗 IgE 抗体接触便被触发，释放出组织胺等化学介质。IgE 髓细胞瘤蛋白质的 Fc_ε 片段能抑制 IgE 和人白血球和猴肺组织的结合，表明 IgE 分子是通过 Fc_ε 和靶细胞表面的 Fc_ε 受体结合的。较近的实验证明 Ig E 和嗜碱性白血球结合，而不和其它颗粒白血球或淋巴球结合。在肺和皮肤等组织内 IgE 的靶细胞是肥大细胞。

4. 反应素抗体过敏反应的初始机制可能是和靶细胞表面结合的 IgE 分子之间被多

价变应原"搭桥"所引起的 IgE 分子间的相互作用。这种相互作用引起 IgE 的 Fc 构象变化，从而诱发靶细胞表面的一系列酶反应，导致组织胺等化学介质的释放。

反应素抗体的化学本质的发现，以及其作用的分子细胞学机制的初步阐明，对于了解和控制变态反应性疾病有重要的理论和实践意义。这对于变应性学（Allergology）可认为是和组织胺的发现有同等的或更为重要的意义。

（六）免疫球蛋白 D(IgD)

IgD 是由于对一种特殊的人髓细胞瘤蛋白质的研究而发现的（Rowe 和 Faheg, 1965）。血清中 IgD 的含量很低，并且在提取过程中易于聚合，又易降解。因此，Ig D 化学结构的研究进展很慢。关于 Ig D 的抗体活力，目前还只有一些零星的资料，也没有发现和其他种类免疫球蛋白共同的免疫学功能。总之，这方面的研究还处于初始阶段，材料很少。所以暂且附在这一章，作一些简略的介绍。

1. 理化性质

(1) 提取

Ig D 通常是从髓细胞瘤病人血清中提取的。由于 IgD 很容易被血清中的蛋白酶（溶纤酶等）分解，因此整个提取过程都应加氨基己酸（0.02 *M*）保护。提取步骤是先经过 Deae-纤维素层析，再经 Sephadex-G200 凝胶过滤，就可以得到相当纯的 IgD。如直接从正常血清开始，产物可能杂有相当大量的 IgA 和 β-球蛋白，需用抗 IgA 免疫吸附剂进一步纯化。

(2) 基本理化性质

根据对七种 IgD 髓细胞瘤蛋白质的研究结果，发现 IgD 的沉降常数 S_{20w} 为 6.14—7.04，平均为 6.55。分子量范围约为 172,000—200,000(Spiegelberg, 1970; Rowe 等，

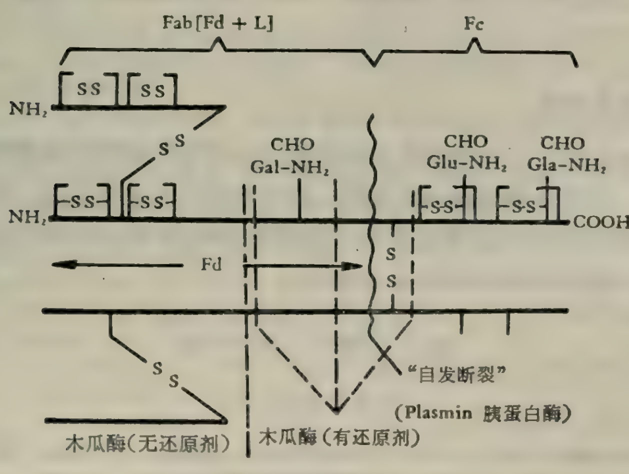


图 9-11 IgD 分子构造的初步模型 (Spiegelberg, 1972)。

1969)。

IgD 分子是由两条相同的轻链（κ 或 λ）和两条特殊的重链（δ 链），被 3 个链间二硫桥相连而成的。每条 δ 链(分子量为 60,000—70,000)，含有 4 个链内二硫键，2 个位于 Fd，2 个位于 Fc。IgD 重链的抗原性不均一，提示可能存在两个 IgD 亚类或同种异型 (Rivat 和 Ropartz，1971)。IgD 含醣量相当高，达到 12%，分布在至少 3 个肽段。以含氨基半乳糖为特点的糖多肽位于“铰链区”；另 2 个含氨基葡萄糖为特点的糖多肽位于 Fc。在无还原剂存在时，木瓜酶能在含氨基半乳糖的糖多肽段靠 N 端的一侧将 Ig D 的 δ 链切断。有还原剂时，则可以从多处切断。IgD 的另一特点是容易被蛋白酶酶解，并且易于“自发”地断裂(图 9-11)。

2. 生物学性质

(1) 含量和代谢率

大多数正常人 (70%) 血清内，IgD 含量很低 (20—50 微克/毫升)，少数人偏高(约 100—400 微克/毫升)或偏低 (<3 微克/毫升)。血清 IgD 浓度变异的原因还不清楚，只知道这不大可能是由于遗传的原因，因为同卵双生子也有差别。据推测很可能人体只对少数抗原刺激起反应才产生 IgD 抗体，因而在个别被抗原致敏的个体，IgD 浓度有所增加。各种疾病时，IgD 浓度有明显变化，但还找不出规律性联系。过敏或自身免疫病人，没有发现 IgD 含量的反常现象。用萤光标记抗体法，在脾、淋巴结和增殖腺内偶尔可见染 IgD 的浆细胞。IgD 代谢很快，血清内半衰期约为三天。

(2) 抗体活力

目前所有关于 IgD 抗体活力的证据都是间接得到的：

1) 萤光标记抗体法　某些自身免疫病，如 40—50% 的全身性红斑狼疮病人血清中存在 IgD 抗细胞核抗体；约 20% 的类风湿性关节炎病人，以及少数 (1/26) 的桥本氏病人(自身免疫性甲状腺炎)中，也都存在 IgD 抗体。

2) 某些过敏病人血清中，存在抗青霉素的 IgD 抗体 (Gliech 等，1969)，抗胰岛素的 IgD 抗体，以及少数对牛奶过敏病人 (3/20) 血清中存在抗 BSA 和 BGG 的 IgD 抗体。

(3) 其他免疫学功能

IgD 不能固定补体；不能使豚鼠皮肤致敏；不能诱发嗜中性球释放溶酶体酶。近来才有人发现 4.5% 新生儿脐带血内含 IgD，其中至少一半来自胎儿。鉴于已知新生儿血清内 IgM 的高水平和先天性感染有关系，脐带血内 Ig D 的存在有无诊断上的意义，尚需进一步的研究 (Leslie 和 Swate，1972)。

参　考　资　料

免疫球蛋白 IgE

Bennich, H. and Johansson, S G. O. (1971). Structure and function of human IgE. *Adv. Immunol.* **13**, 1.

Bennich, H. and H. von Bahr-Lindstöm (1974). Structure of immunoglobulin E (IgE). Progress Immunol. II., Vol. 1. Immunochem. Asp., p. 49.

Bennich, H., Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Johansson, S. G. (1969). A comparative antigenic study of γ E-globulin and myeloma-IgND. *J. Immunol.* **102**, 826.

Broghton, B. J., et al. (1974). New inhibitors of reagin-mediated anaphylaxis. *Nature* **251**, 650.

Conrad, D. H., Berczi, I. and Froese, A. (1976). Characterization of the target cell receptor for IgE. I. Solubilization of IgE-receptor complexes from rat mast cells and rat basophilic leukemia cells. *Immunochemistry* **13**, 329.

Hamburger, R. N. (1976). Peptide inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction. *Science* **189**. 389.

Ishizaka K. (1970). Immunoglobulin E. In: ''Immunoglobulins'', ed. by Merler, Nat. Acad. Sci., Washington D. C., p. 122.

Ishizaka K. (1973). The identification and significance of gamma E. In: ''Immunobiology'', ed. by Good, R. A. and Fisher, D. W., Chap. 9, p. 84.

Ishizaka, K. and Ishizaka, T. (1966). Physicochemical properties of reagenic antibody. I. Association of reagenic activity with an immunoglobulin other than gamma A or gamma G-globulin. *J. Allerg.* **37**, 169.

——— and ——— (1967). Identification of gamma-E antibodies as a carrier of reagenic activity. *J. Immunol.* **99**, 1187.

——— and ——— (1971). Human reagenic antibodies. In: ''New concepts in allergy and clinical immunology,'' p. 31.

——— and ——— (1971). Mechanisms of reaginic hypersensitivity: a review. Clin. Allergy **1**, 9.

Ishizaka, K. and Newcomb, R. W. (1970). Presence of γE in nasal washings and sputum from asthmatic patients. *J. Allerg.* **46** 197.

Ishizaka, K., Ishizaka, T., Lee E. H. and Fudenberg, H. (1965). Immunochemical properties of human A isohemagglutinin. I. Comparisons with γ G-and γ M-globulin antibodies. *J. Immunol.* **95**, 197.

Ishizaka, K., Ishizakka, T. and Hornbrook, M. M. (1966). Physicochemical properties of reagenic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity *J. Immunol* **97**. 75.

———, ——— and ——— (1966). V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-glubulin antibody *J. Immunol.* **97**, 840.

———, ——— and ——— (1967). Allergen binding activity of gamma E, gamma G and gamma A antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurements of reaginic antibody. *J. Immunol* **98**. 490.

———, ——— and ——— (1970). A unique rabbit immunoglobulin having homocytotropic antibody activity. *Immunochem.* **7**. 515.

Ishizaka K., Ishizaka, T. and Lee, E. H. (1966). Physicochemical properties of reaginic antibody. II. Characteristic properties of reaginic antibody different from human gamma-A-isohemagglutinin and gamma-D-glubulin. *J. Allerg.* **37**, 336.

———. ———, and ——— (1970). Biologic function of the Fc fragments of γ E myeloma protein. *Immunochem.* **7**, 687.

Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Tada, T. (1969). Immunoglobulin E in the monkey. *J. Immunol.* **103**. 445.

Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Terry, W. D. (1967). Antigenic structure of γE globulin and reaginic antibody. *J. Immunol.* **99** 849.

Ishizaka K., Ishizaka, T. and Tomioka, H. (1971). Demonstration of passive sensitization of monkey mast cells by IgE. *J. Allerg.* **47** 89.

Ishizaka, T.. Ishizaka. K., Johansson, S. G. and Bennich. H. (1969). Histamine release from human leucocytes by anti-gamma E antibodies. *J. Immunol.* **102**, 884.

Ishizaka, T., Ishizaka, K., Bennich, H. and Johansson, S. G. (1970). Biologic activities of aggregated immunoglobulin. *J. Immunol.* **104**, 854.

Ishizaka T., Ishizaka, K. Orange R. P. and Austen, K. F. (1970). The capacity of human immunoglobulin E to mediate the release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from monkey lung. *J. Immunol.* **104**, 335.

Ishizaka T., Sato, C. and Ishizaka, K. (1972). Characteristic of complement fixation by aggregated IgE *J. Immunol.* **109**, 1290.

Ishizaka, K. Tomioka, H. and Ishizaka, T. (1970). Mechanism of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leucocytes. *J. Immunol* **105**, 1459.

Ishizaka, T. Tomioka H. and Ishizaka, K. (1971). Degranulation of human basophil leucocytes by

anti-E antibody. *J Immunol.* **106**, 705.

Ishizaka. T. et al. (1972). Identification of basophil granulocytes as a site of allergic histamine release. *J. Immunol.* **108**, 1000.

Ishizaka, T., et al. (1972). Release of histamine and slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) by IgE-anti-IgE reactions on monkey mast cells. *J. Immunol.* **108**, 513.

Johansson, S. G., and Bennich. H. (1967). Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunol.* **13**, 381.

Johansson, S. G., Bennich, H. and Berg, T. (1972). The clinical significance of IgE. Progr. in Clin Immunol., p. 157.

Johansson, S. G., Bennich H. and Wide, L. (1968). A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunol.* **14**, 265.

Korotzer, L. and Haddad, Z. A. (1970). In vitro detection of human IgE mediated immediate hypersensitivity reaction to pollens and penicillins by a modified rat mast cell degranulation technique. *J. Allergy* **45**, 126.

Korotzer, T. L., Haddad. Z. H. and Lopapa, A. I. (1971). Detection of human IgE antibody by a modified rat mast cell degranulation technicque. *Immunology* **20**, 545.

Kimura, Y., et al. (1974). Further studies on rat mast cell degranulation by IgE-anti-IgE and the inhibitory effect of drugs related to c-AMP. *Immunol.* **26**, 983.

Magro, A. M. and Alexander, A. (1974). In vitro studies of histamine release from rabbit leucocytes by divalent haptens. *J. Immunol.* **112**, 1757.

Newman, S. A., Rossi. G. and Metzger, H. (1977). Molecular weight and valence of the cellsurface receptor for immunoglobulin E. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **74**, 869.

Nezlin, R. S., et al. (1973). Properties of myeloma immunoglobulin E (Yu). Chemical, fluorescence polorization and spin-labeled studies. *Immunochem.* **10**, 681.

Ogawa. M., Kochwa, S., Smith, C., Ishizaka. K. and McIntyre, O. R. (1969). Clinical aspects of IgE myeloma. *New. Eng. J. Med.* **281**, 1217.

Orange. R. P., and Austen. K. F. (1973). Chemical mediators of immediate hypersensitivity. In: "Immunobiology". p. 115.

Stanworth, D. R. (1970). Immunochemical mechanisms of immediate type hypersensitivity reactions. *Clin. Exp. Immunol.* **6**, 1.

Stanworth, D .R., Humphrey, J. H., Bennich. H. and Johansson, S. G. (1968). Inhibition of Praustnitz-Küstner reaction by proteolytic-cleavage fragments of a human myeloma protein of Ig class E Lancet ii, 17.

Tada, T. and Ishizaka, K. (1970). Distribution of gamma-E forming cells in the human and monkey lymphoid tissues. *J. Immunol.* **104**. 377.

Yamamoto S. et al. (1972). Cyclic AMP-induced inhibition of IgE mediated hypersensitivity in human skin. *Immunol.* **24**, 77.

免疫球蛋白 IgD

Gleich, G. T.. Bieger, R. C. and Stankievic. R. (1969). Antigen combining activity associated with immunoglobulin D. *Science* **165**. 606.

Leslie G. A. and Swate, T. E. (1972). Structure and biologic functions of human IgD in human cord serum sera. *J. Immunol.* **109**, 47.

Rivat. C., Ropartz, C. and Rowe, D. S. (1971). Antigenic heterogeneity of human IgD immunoglobulins. *Nature New Biol.* **231**, 280.

Rowe, D. S., et al. (1969). Studies in human IgD. Immunochem. **6**, 437.

Spiegelberg, H. L. (1972). D Immunoglobulin. In: "Contemporary topics in immunochemistry". Vol 1, p. 165.

第十章　抗原结合位点的结构

抗体的最显著的特性是和抗原结合的高度专一性和这种专一性的多样性。抗体的抗原结合专一性无疑地依赖于抗原结合位点的空间构象，因而归根结蒂依赖于其一级结构。然而，一个结构稳定的抗体分子如何发生排列顺序上足够多的变异以适应于识别多种多样的抗原决定簇的需要而又不致于破坏这种分子的稳定性，曾经是一个难以思议的问题。如第七章所述，直到抗体分子的重链和轻链可区分为不变区（C）和易变区（V）的发现，才开始找到了解决这一难题的门径。根据现有的抗体分子结构的知识，抗原结合位点位于 Fab 末端，并由重链和轻链的易变区共同组成。因此，进一步的研究便集中到从各方面来探索易变区多肽链的微细结构、空间排布与结合专一性的关系，以及抗原结合位点变异性的遗传控制等问题。

一、抗原结合位点的大小和一般性质

以往关于抗原结合位点的大小和性质的概念，主要是从抗原决定簇的空间互补性的研究得到的。从第一章 18 页已知，抗原结合位点的大小相当于 4—6 肽或 6 聚糖，即大约 34×12×7Å 大小。 Fab′ New 的低分辨率晶体模型所显示的抗原结合位点的大小，也是与此相符合的（Poljak, 1972）。抗体的抗原结合位点的大小和酶的专一的活性中心大小很相近，例如溶菌酶的底物结合位点相当于 6 单糖单位（Philips, 1967）；木瓜酶的底物结合位点相当于 7 氨基酸单位；羧肽酶的底物结合位点相当于 4 或 5 氨基酸单位。因此，酶活性中心的知识和研究方法也可供抗体的抗原结合位点研究的借鉴。从已知立体结构的近 12 种酶看来，酶的活性中心是由分散在多肽链不同段落上的 15—20 氨基酸残基共同组成的一条沟或槽。同样的，抗体的抗原结合位点也可能是由分散在重链和轻链的易变区上的 10—20 个氨基酸残基构成的。

对各类免疫球蛋白的抗原性和化学结构的研究表明，抗体的结合专一性是由 Fab 上重链和轻链的易变区（V_L+V_H）共同决定的，而与不变区无关。免疫球蛋白之类、型、亚类的构造区别和结合专一性没有恒定的联系，因为各种类、型的抗体都可能具有相同的结合专一性。同种异型专一性之决定簇通常分布在轻链和重链的不变区，显然和抗原结合专一性无关。 唯一已知的例外是家兔重链的同种异型决定簇分散在易变区（V_H）的 10、13、15、16、17、27、28、29 和33，以及 80、81、82、83、84 和 85 位置（Fleishman, 1971; Mole 等，1971）。可是，其同种异型专一性和抗原结合专一性仍然没有确定的联系。 此外，抗体和抗原的结合不影响同种异型专一性的表现；反之，抗同种异型血清和相应的抗体结合，也不能封闭抗体的抗原结合位点。这些事实也支持同种异型专一性和抗原结合专一性没有内在联系的结论。然而，却有事实表明专一的半抗原（如 P-硝基苯甲酸）能抑制抗个体型抗体的抗血清和该个体型抗体的结合。这一事实可能是由于有关的某些个体

型抗原决定簇包含在抗原结合位点的区域内，或者抗体和半抗原的相互作用改变了 $F(ab')_2$ 上面的个体型决定簇的构象（Brient 和 Nisonoff, 1970）（参看第六章 186 页）。

二、抗原结合位点的结构基础

如上所述，抗体的抗原结合位点可能位于 Fab 末端，分散在重链和轻链易变区上，相当于10—20 氨基酸残基的区域，其构象特性决定免疫反应的专一性。这一看法得到以下四方面研究结果的支持。

（一）半抗原的存在和抗体结构的稳定性

家兔抗 DNP-抗体对 ε-DNP-赖氨酸有很高的亲合力（$Ka = 10^8$ 升/克分子）。当抗体和半抗原结合后，用 4*M* 盐酸呱处理也不能使抗体-半抗原复合物解离，需要增加到 7.5*M* 浓度才能使它全部解离。没有半抗原存在时，抗体只要经 4*M* 盐酸呱处理 6 小时就变性；可是和半抗原结合后，同样条件下只发生部分变性。萤光灭活测定也表明半抗原存在对抗体的构象有明显的稳定影响（Cathou 和 Werner, 1970）。半抗原和抗体结合后能使抗体构象趋于稳定的事实提示，分散在重链和轻链的不同段落的氨基酸残基可能共同参与抗原结合位点的组成，因而半抗原和抗原结合位点的相互作用可维持这种构象的稳定（图 10-1）。

目前认为重链和轻链可能各自提供部分的抗原结合位点；或者对于一些抗体也可能主要由重链提供抗原结合位点，不过必须要有轻链的同时存在才能维持抗原结合位点的有效能的构象（Edelman 等，1964）。

（二）亲合标记研究

对于抗体的抗原结合位点的细微结构更直接的研究方法是在酶的活性中心研究上行之有效的亲合标记法（Affinity-labeling method）。这种研究方法的原理是采用一种和抗体有高度亲合力并带有反应基团的半抗原作为标记剂。标记剂半抗原决定簇先和抗体的抗原结合位点专一地结合，然后所带的反应基团再和结合位点附近的氨基酸残基的侧链发生牢固的共价结合（图 10-2）。将抗体分子解离、酶解后，分离出带标记的肽段，测定其排列顺序，再和已知的重链或轻链的排列顺序相比较，就可以确定标记地点在多肽链上的位置，并据此推测结合位点的构造。这一方法曾用于几种酶的活性中心的分析。后来 X 射线晶体分析的实验结果，证实了这一方法的可靠性（Singer,1967）。

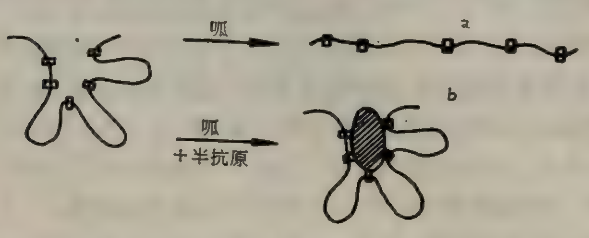


图 10-1　盐酸呱对抗体的抗原结合位点的变性作用。(a) 无半抗原存在；(b) 有半抗原存在，构象趋于稳定（据 Cathou 和 Werner, 1970）。

Wofsy 等（1962）最先用这一方法来分析抗体的抗原结合位点的微细构造。他们用P-砷酸-苯氟硼酸重氮盐（P-arsonic acid-benzenediazonium fluoroborate）作为标记剂，处理家兔抗苯砷酸抗体。根据吸收光谱变化判断，标记反应完全发生在 Tyr 残基。重链和轻链都被标记，标记量的比例，重链比轻链多一倍。酶解后分离标记的肽段，从重链得到-Tyr*-Tyr*-，从轻链得到-Val-Tyr*-。

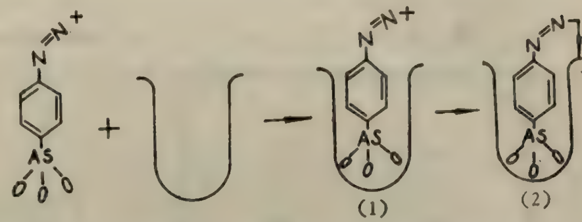


图 10-2 亲合标记机制。(1) 半抗原决定簇和抗体的结合位点结合；(2) 半抗原上的反应基团再和结合位点邻近的氨基酸共价结合（据 Givol, 1973）。

Franěk（1971）用 m-硝基苯氟硼酸重氮盐标记猪抗体，结果从轻链（λ 链）的消化产物分离出两个标记的肽段。根据和已知猪 λ 链排列顺序相比较，可确定两个标记肽段都含有 Tyr 残基，一个位于 33 位置，另一个位于 93 位置。另一些工作者，用同一亲合标记剂处理小鼠髓细胞瘤 IgA（MOPC 315），发现标记剂几乎全和轻链结合（1.4 克分子标记剂/1 克分子蛋白质），标记的片段相当于顺序 24—56 肽段，其中标记的 Tyr 残基位于 34 位置。有趣的是，这和上述猪抗体的标记肽段有相当大的相似性：

小鼠：-Val-Thr-Thr-Ser-Asp-Tyr*（-Ala, Ser）Try-Ile-

猪：-Val-Thr-Thr-Ser-Asn-Tyr*-Pro-Gly-Try-Phe-

用链长不同的 BADE 同系物 DNP 亲合标记剂（均含有 ^{14}C-溴乙酰反应基团），标

试剂		标记的残基和链	
		%Tyr (L)	%Lys (H)
BADE	DNP-NH-CH_2-CH_2-NH-X	96	4
BADB	DNP-NH-CH_2-CH_2-CH(COOH)-NH-X	87	13
BADO	DNP-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH(COOH)-NH-X	66	34
BADL	DNP-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(COOH)-NH-X	5	95

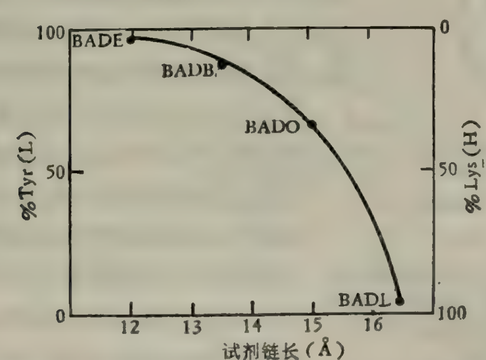


图 10-3 链长不等的几种 BADE 同系物试剂对 MOPC315 髓细胞瘤蛋白之亲合标记专一性。图上方示不同试剂标记的肽链和氨基酸残基的比例。下图示标记专一性和试剂链长的关系（$x = COCH_2Br$）（Givol, 1973）。

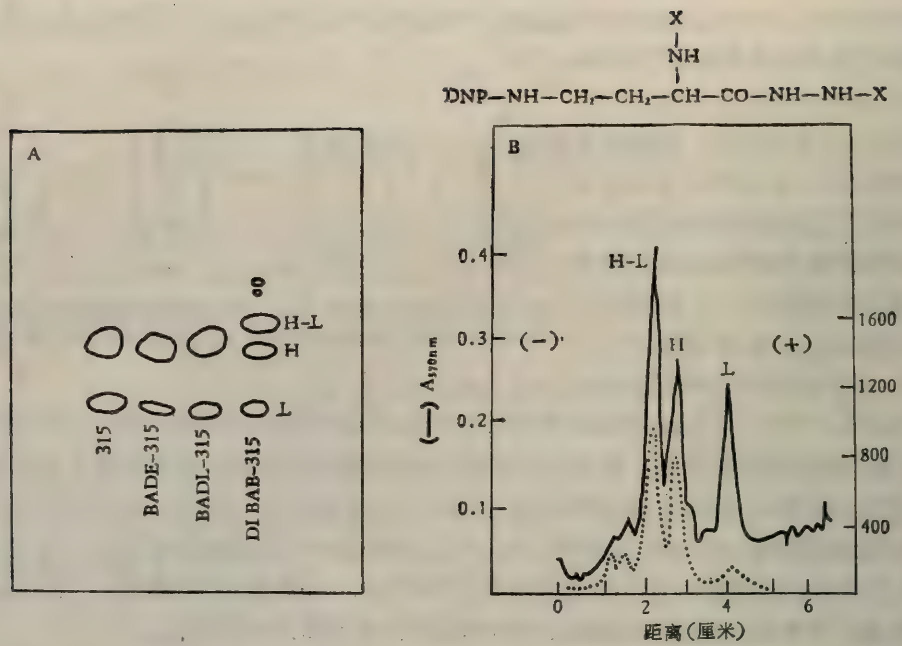


图 10-4 DIBAB、BADL 和 BADE 标记的 MOPC315 之 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。(A) 亲合标记的 MOPC315 的肽链的电泳图,从上向下迁移。(B) DIBAB 标记的蛋白在凝胶内肽链和放射性的分布。H为重链,L为轻链,H-L 为交连的重链和轻链(据 Givol, 1973)。

记同一种具有抗-DNP 抗体活力的小鼠髓细胞瘤蛋白(MOPC 315),结果发现 BADE、BADB 在很大程度上标记 L 链的 Tyr 残基,而 BADL 则标记 H 链的 Lys 残基(图 10-3)。BADL 和 BADE 的链长差别约为 5 Å,而标记专一性无论在链的种类和残基的类别方面都改变了。这提示两种试剂反应专一性的差别很可能和标记剂的链长,即溴乙酰基团在链上的位置有关系。如果这一假定是对的,一个双功能基试剂,其两个溴乙酰基团之间的距离正好相当于 BADL 和 BADE 链长之差(约 5 Å),就应有可能同时和 Lys 和 Tyr 残基反应,从而把 H 链和 L 链交叉连接起来。实际上,如图 10-4 的数据表明的,一个双功能基的亲合标记剂:

DNPHN—$(CH_2)_2$—CH—(—$HNCOCH_2Br$)$CO(NH_2)COCH_2Br$(DIBAB) 确实能和 H、L 链交叉连接,产生一个分子量为 72,000 的复合分子(Givol 等,1971)。对两条链的交叉连结的实验证明,抗原结合位点构造内,H 链和 L 链在空间排布上,彼此很靠近,如简图 10-5 所示。这些结果还提示,抗原结合位点的构造可能是相当固定的,半抗原在其中很少有活动的余地,因而与之结合的半抗原亲合标记剂的化学反应完全依赖于溴乙酰反应基团所处的精确位置,标记上和它最靠近的一个残基。因此,系统地改变亲合标记剂的结构,在理论上就有可能测绘出抗原结合位点附近肽链排列顺序和组成抗

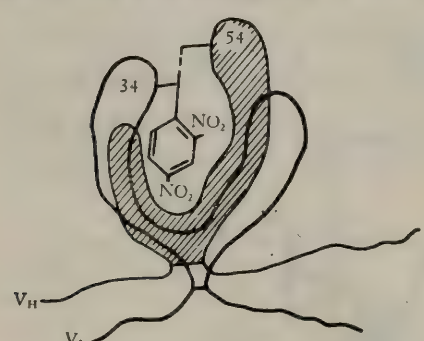
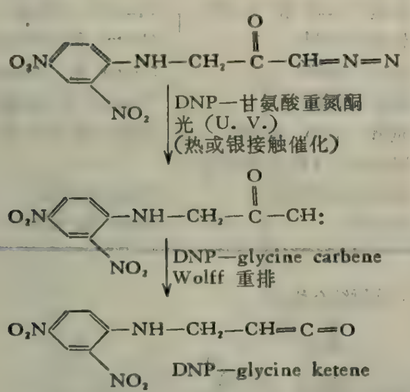


图 10-5 抗原结合位点简图,示双功能基标记剂(DIBAB)交叉连接重链和轻链。数字表示重链和轻链上亲合标记和交叉亲合标记的位置(据 Givol, 1973)。

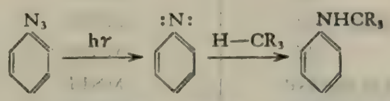
原结合位点的残基之间的空间关系。

对于亲合力低的免疫球蛋白，或天然的抗体混合物，最好采用在和抗体的抗原结合位点结合后，其反应基团才被激活的亲合标记剂。目前已有两种这样的亲合标记剂可供使用，一种是重氮酮类（Diazoketone），另一种是芳香族叠氮（Aromatic azide）。其反应机制如下：



(Ketene 可与 Tyr, Lys, His 残基起反应。Carbene 可加入 C—H 链，而与任何氨基酸残基起反应。)

重氮酮类试剂



（芳香族叠氮被光激活，产生的一个nitrene 可加入C—H链，N—H链或—SH 基。因此，可与任何氨基酸残基起反应。）

芳香族叠氮试剂

硝基叠氮（Nitroazide）试剂还有一个优点，可以先在暗处置换到一个蛋白质载体上，注射到家兔使产生针对此潜在活性基团的抗体。这样产生的抗体和硝基叠氮试剂先在暗处接触时，潜在活性基团作为一个抗原决定簇和抗体之抗原结合位点结合；再在光激活条件下，潜在活性团被激活，结果便能直接标记构成抗原结合位点的氨基酸残基，而不是标记邻近的残基。

上述三类亲合标记剂对家兔抗体，都优先标记重链（标记量 H:L＝2:1 至4:1）。通常在重链邻近 Cys-94的几个氨基酸残基常被标记上(Thorpe 和 Singer, 1969; Press 等, 1971)。综合这几类实验的结果，总结于表 10-1。

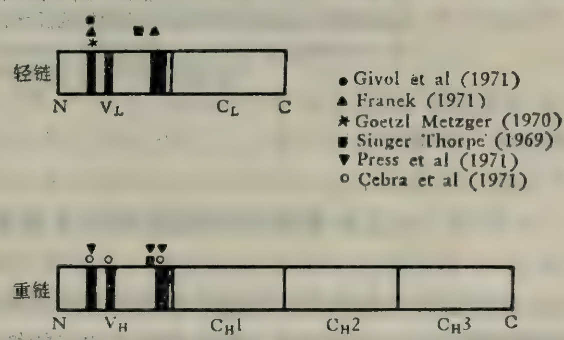


图 10-6　重链和轻链的不变区和易变区。粗黑线表示排列顺序分析测定高变异区的位置。符号指示亲合标记残基的位置（据 Haber 和 Cathou, 1972)。

从下表可见，两种髓细胞瘤蛋白，几种抗-DNP 抗体，用不同的亲合标记剂试验的结果，都说明轻链和重链上有三个段落，即靠近轻链易变区（V_L）Cys-22 一侧的 30 位置附近的残基，邻近 Cys-94 的几个残基以及 50 位置附近的残基都可能被标记，并且在重链上和轻链上几乎是对称的位置，也同样可能被标记(图 10-6)。从下一节可以看到，这些肽段正好位于 V_H 和 V_L 的高变异区内。因此，可以假定这些段落上的高变异的残基很可能由于多肽链的折叠而彼此在空间上靠近，共同组成专一的抗原结合位点（图 10-7）

表 10-1　各种抗-DNP 免疫球蛋白亲合标记的残基的比较

蛋白质	试剂	标记的残基	文献
MOPC 315	BADL	重链 Lys54	Haimorich 等,(1972)
315	BADE	轻链 Tyr34	同上
460	BADE	轻链 Lys54	同上
猪抗-DNP	MNBD	轻链 Tyr33 和 Tyr93	Franek (1971)
315	MNBD	轻链 Tyr34	Goetzl 和 Metzger,(1970)
家兔抗-DNP	MNBD	重链 Tyr96	Singer 和 Thorpe, (1968)
小鼠抗-DNP	MNBD	轻链 Tyr86	Thorpe 和 Singer, (1969)
豚鼠抗-DNP	MNBD	重链 Tyr33, Tyr60 以及 99—119 之间位置	Cebra 等,(1971)
家兔抗-NAP	NAP	重链 Cyst98 和 Ala99	Porter (1971) Press 等(1971)



图 10-7　易变区抗原结合位点的一条多肽链折叠示意图。主要表示三个亲合标记肽段(高变异区)如何由于多肽链的折叠而彼此靠近，共同组成抗原结合位点。排列顺序数字按 V_H。V_H 或 V_L 上的标记位置按表 10-1 的资料。黑圈代表高度变异区的位置(据 Givol, 1973)。

(Givol, 1973)。

(三) 重链和轻链易变区氨基酸排列顺序的统计分析

由于各种免疫球蛋白轻链和重链排列顺序测定资料日益增多，这就提供了通过对这些排列顺序的比较研究来了解抗原结合位点的细微结构和建造规律的可能性。Wu 和 Kabat (1970) 把所有已知排列顺序的小鼠和人的轻链，按尽可能有最大同源性的方式排列，留出一些缺失和插入的肽段，然后再加以统计分析。用下述公式求出变异率 (V)：

$$\text{变异率}(V)=\frac{\text{一定位置出现过的不同的氨基酸种类的数目}(N)}{\text{此位置最常见的氨基酸的频率}(F)}$$

例如在轻链的 7 位置，共 63 条轻链的数据中，出现过四种不同种类的氨基酸 (Pro, Thr, Ser, Asp)，故 $N=4$。其中最常见的是 Ser，出现在 41 条链上。所以其频率 $(F)=41/63=0.65$。从上式得出变异率：$V=N/F=4/0.65=6.15$. 按上述公式，一个不变残基的变异率应为 1，而理论上的最大变异率应为 400。

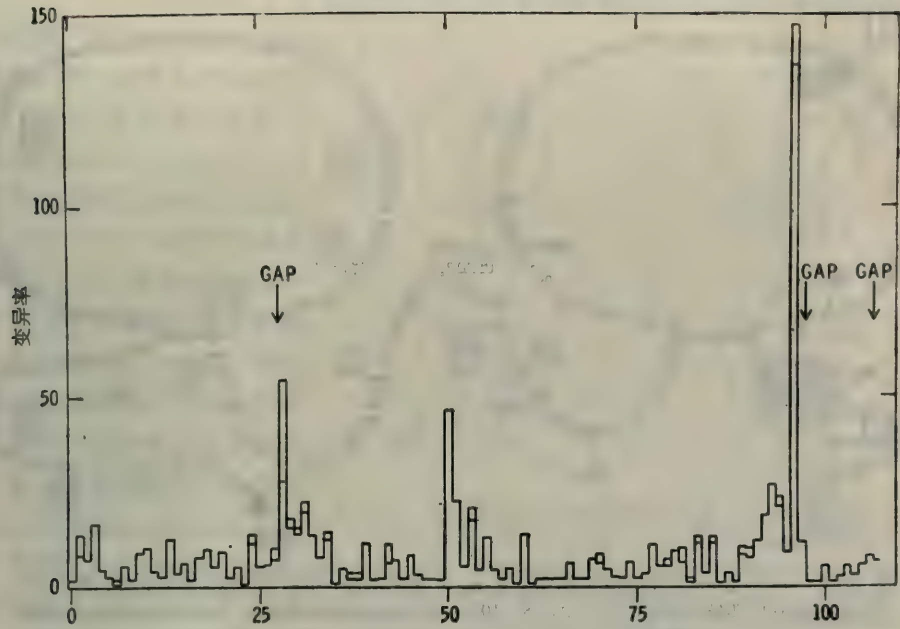


图 10-8　轻链易变区不同氨基酸位置的变异率。GAP 为插入的肽段(据 Wu 和 Kabat, 1970)。

按上述方法求出轻链易变区各位置的变异率，并对排列位置作图，结果见图 10-8。从图上可见，轻链上存在三个高变异区，即 24—34，50—56 和 89—97 区域。其中 28、50 和 96 位置变异率达到最高峰。缺失或插入的肽段位于 28 和 96 位置。已知轻链易变区 (V_L) 二硫键位于 Cys-23 和 Cys-88 (Wu 和 Kabat, 1970)。特别值得注意的，变异率最高的区域正好都是在易变区链内二硫键的两个半胱氨酸 (Cys-23 和 Cys-88) 靠 C 端区域。其次，才是 50—60 位置之间的区域(图 10-8；图 10-10)。

同样奇异的现象是易变区内某些位置(尤其是二硫键)是恒定不变的(在各条轻链上出现的频率达到 88—100%)。如果把各条轻链的易变区，按最大同源性排列，留出缺失或插入肽段时，就会发现链内二硫键的位置总是恒定的，其邻近的某些氨基酸残基也几乎是恒定的。Kabat (1967) 注意到人类 κ 和 λ 链各有 27 个这样的不变位置，其中 7 个位置是 Gly。这些恒定位置很靠近高变异率区，特别是 99 和 101 位置的两个不变的 Gly 很接近变异率最高的位置(图 10-9)。由于 Gly 是唯一没有侧链的氨基酸残基，它出现于高变异率区附近，可解释为留出在这些位置上氨基酸残基置换时所需要的伸缩余地的空间。

重链易变区的初步分析同样发现类似的情况，也有 4 个高变异区存在，包括 31—35，50—65，81—87 和 95—102 位置 (Kabat 和 Wu, 1971) (图 10-10)。

总之，根据现有资料的统计分析表明，轻链上有 3 个高变异区，变异率最高的位置是在 95—96 范围。第 1 高变异区起始于 Cys-23 之后，终止于恒定残基 Try-35，而第 3 个高变异区起始于 Cys-88 之后，终止于恒定残基 Phe-97 和 Gly-99,-101。这两个高变异区被 V_L 之链内二硫键拉拢，在空间上彼此靠得很近。第 2 高变异区 50—56 之后，也有一段低变异的区域。同样地，重链上也有 4 个高变异区存在，变异率最高的位置也是

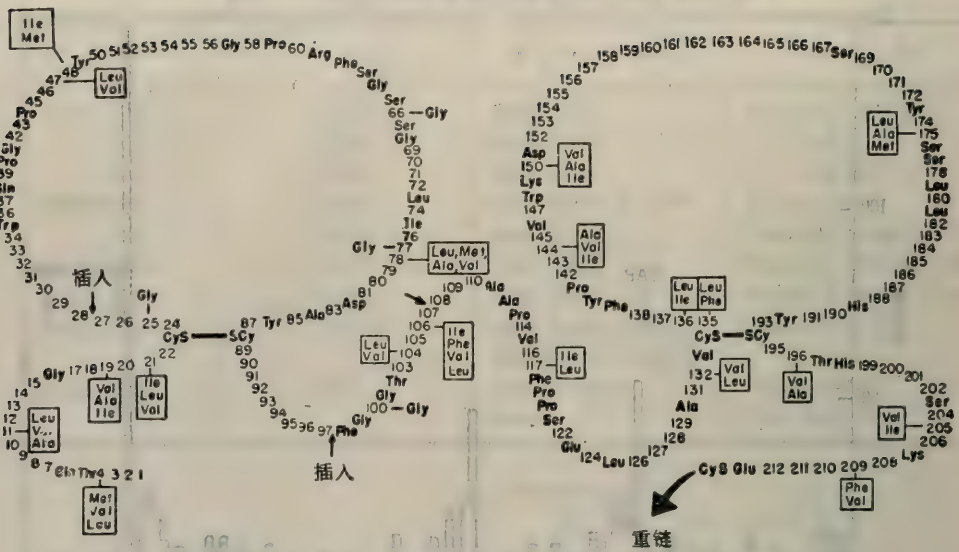


图 10-9 Bence-Jones 蛋白的排列顺序。人 κ、λ 链和小鼠 κ 链的恒定残基列人此排列顺序。恒定残基是指在已知排列顺序的蛋白中，88—100% 在该位置有此氨基酸。方框内为置换的疏水性氨基酸残基。易变区有两个插入的肽段(据 Kabat, 1971)。

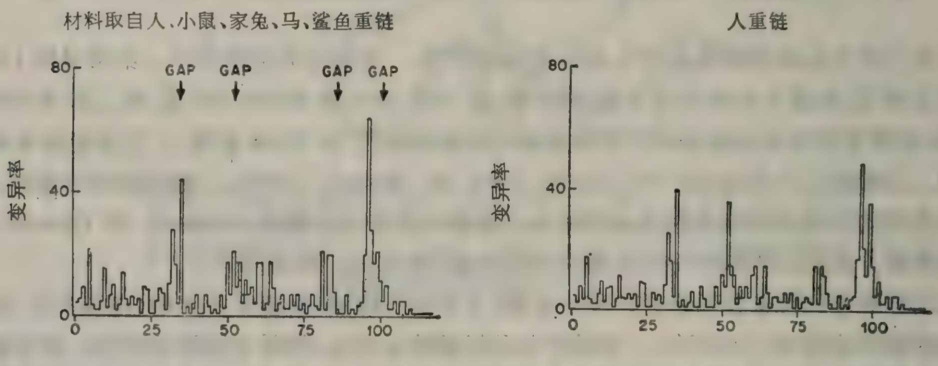


图 10-10 重链易变区不同氨基酸位置的变异率。GAP 为插入的肽段(据 Kabat 和 Wu, 1971)。

在 96 附近。已知 V_H 之链内二硫键的位置是在 22 和 92。因此，第 1 高变异区（31—35）和第 4 高变异区（95—102）也被这一对链内二硫键拉拢。对照前一节的结果（比较图 10-7 和图 10-9），可以清楚地看出，轻链和重链的这些高变异区正好和上述亲合标记实验中经常被标记的肽段重合，并且这些区域被链内二硫键拉拢，并借助于恒定残基的支持，彼此在空间上很靠近。这两方面的事实相互印证，有力地支持这样的看法：高变异区的残基参与抗体的抗原结合位点的组成，而恒定残基则维持易变区基本结构的稳定性。由于高变异区残基的高度变异性，从而保证了抗原结合位点能有极其多种多样的结合专一性。

抗体的抗原结合位点的功能在结构上的要求是高度的变异性，同时又保持其基本结构的稳定性。在易变区全部 107 氨基酸残基中，80 个位置可能发生置换的情形下，多肽链又如何能保持基本的立体构象的稳定性呢？从上述可见，以易变区二硫键为中心（轻链

Cys-23 和 Cys-88；重链 Cys-22 和 Cys-94)，在高变异区的附近有很稳定的排列顺序，这些位置可能包括同种异型专一性的肽段（如家兔γ链的 27—29 和 85—90 位置）以及人类轻链的亚型决定簇肽段。可以设想抗体的抗原结合位点的结构就是以这些稳定的残基作骨架(尤其是二硫键)，因而保证了高度变异的结合位点的基本结构的稳定性。其中，链内二硫键在保持抗原结合位点的基本结构的稳定性上起关键作用。链内二硫键附近，变异率最高。在此稳定地点出现的变异，不致波及其他部位引起抗原结合位点结构上过大的变动，而影响其基本结构的稳定性（图 10-11）。抗体分子的这种结构模型对于在进化过程中保持分子总的构象的稳定性，同时又适应功能上的高度变异性，是有重要意义的。

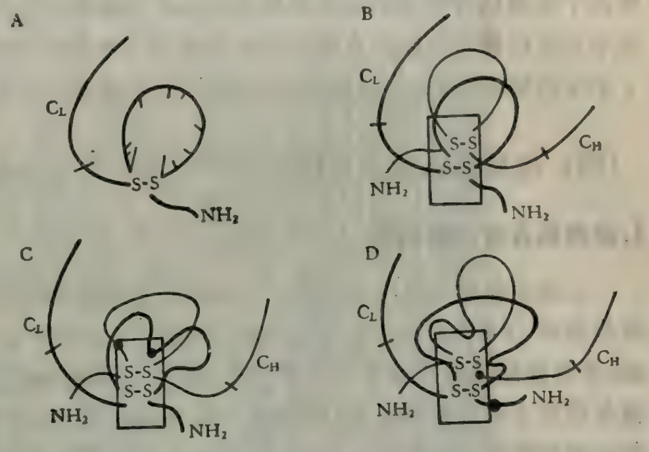


图 10-11　易变区链内二硫键在稳定抗原结合位点中所起的作用示意图。(A) 轻链二硫环。排列顺序上的变异位置用短黑线表示，线的长度示变异的大小。(B) 重链和轻链共同组成的结合位点方框内。(C) 和 (D) 氨基酸残基的置换，通过接触、调整和补偿残基的变化所引起的二硫键附近构造变化，导致结合位点构象的变化。黑点示置换的残基位置。肽链折叠形状是假想的(据 Edelman, 1971)。

上述抗体的抗原结合位点的构造模型，可以和几种已知立体结构的酶的底物结合位点相比较。所有这些酶的底物结合位点都是由分散在一条盘曲的多肽链构成的恒定骨架不同段落上的 10—20 氨基酸残基共同构成的一道槽或沟。如以溶菌酶分子为例，其中一些残基的改变(如 Asp-101)对整个分子的基本结构没有大的影响。而另一个残基(Asp-52) 和分子其他部分关系密切，任何改变都必然引起其他区域发生补偿性改变，否则整个分子构造就不能维持原来总的构象。另一方面，比较胰糜蛋白酶 (Birktoft 等，1970) 和胰蛋白酶 (Hartley 等，1970) 假定的活性中心，可以看出酶和小分子底物的结合专一性随活性中心结构的微小变化而发生很大的变化。这两种酶活性中心的结构差异仅在 189 位置胰糜蛋白酶是 Ser，如改换为 Asp，就成为胰蛋白酶的底物结合专一性了。由此可见，在整个分子其他部分保持不变，而只有活性中心局部发生微小变化时，对底物结合专一性就会发生很大变化，从胰糜蛋白酶之对含芳香环氨基酸残基或 Leu 残基的肽段结合专一性，改变成胰蛋白酶之对含碱性氨基酸残基的肽段结合专一性。这些看法对于抗体的抗原结合位点的构造模型是有很大启发的。同理，也可以设想抗体的抗原结合位点的构造是由分散在重链和轻链易变区恒定骨架不同段落上的 10—20 高度变异的氨基酸残基共同构成的一条槽形(或沟形)构造。抗原结合位点内，这些高度变异的氨基酸残基的任何置换，都必然引起抗原结合位点局部构象的很大变化，因而也就导致抗原结合专一性的很大变化。

总之，根据以上的论述，抗体的抗原结合位点的结构模型可设想为由分散在重链和轻链易变区恒定骨架上的 10—20 氨基酸残基共同组成的一条槽形(或沟形)构造，其中一些氨基酸残基的高度变异性提供了各种各样的抗原结合专一性的构造基础。同时，还可以

设想这种槽的形状具有某些柔曲性，可以适应于比较广泛的专一亲合力。这种结构模型保证了抗原结合位点的高度变异性和基本结构稳定性之间矛盾的统一。虽然利用现有的化学方法已经对抗原结合位点的恒定骨架内多种多样的专一性和亲合力之结构基础提供了不少的知识，但是这种模型的真实性，还有待高分辨率 X 射线晶体分析的证实。

（四）抗原结合位点及抗原结合位点—半抗原复合物之 X 射线晶体学分析

1. 抗原结合位点的构造

上述用化学方法得到的关于抗体的抗原结合位点结构模型的概念，是和 Fab' New 高分辨率（2.8 Å）的立体模型完全符合的。从图 7-28 可见，V_L 和 V_H 功能区内部，多肽链沿功能区长轴平行方向往返转折，形成稳定的骨架，结果便把原来分散在肽链各段落上的高变异残基（如轻链上的 29、51、92、93 位置）凑集到 Fab 片段的 N 端，这些高变异残基（包括几个 Tyr）的侧链完全外露到溶液中，共同形成一条位于 Fab 末端的浅槽（长宽 15×6 Å，深 6 Å）。重链 55—65 和 30—33 残基构成槽的“下缘”；轻链的 27—30，以及 50 附近的残基，形成槽的“上缘”。轻链的 90—95 附近的残基形成槽的“左侧壁”；而重链的 102—107 残基形成槽的“右侧壁”。根据已知的残基置换，肽段插入（或缺失）出现的位置，推测起来抗原结合位点的几何形状可因残基的置换，或肽段的插入（或缺失）而发生改变。例如，人类 λ 链的一个亚型在 27a，27b，27c 位置缺失三个残基。在 Fab New 立体模型上，这三个残基位于一个螺旋环上，缺失时不致引起肽链走向的重要变化。然而，这种局部构象的微细变化却足以改变其抗原结合专一性。依此类推，以 Fab New 立体模型作基础，根据已知的高变异区排列顺序变化的资料，就可以推测在一个稳定的骨架上，抗原结合位点的空间结构，因而其结合专一性能发生千差万别的变化。此外，按照和 Fab' New 排列顺序的同源性，对比起来，前述亲合标记实验中，许多被标记位置的残基侧链都可能外露在溶液中，因而可以解释它们何以易于和亲合标记半抗原接触（Poljak 等，1973）。

2. 抗原结合位点—半抗原复合物的构造

近来，同一组工作者进一步发现 IgG（New）能和许多半抗原（包括维生素 K_1 的 γ-羟基衍生物）结合（图 10-12）。这就提供了有利条件，对抗原结合位点—半抗原复合物（Fab' New 和 K_1OH）进行 X 射线晶体学分析，直接观察半抗原和抗原结合位点之间的空间互补关系（Amzel 等，1974）。从得到的抗原结合位点—半抗原的 3.5 Å 立体模型上（图 10-14），可以看到维生素 K_1OH 的萘酚环和 Fab New 抗原结合位点浅槽的上部结合，处于 L_3 的 Tyr-30（位于浅槽底部）的酚环，H_3 的 103 残基，以及 L_1 的 Gly-29，Asn-30 残基的骨架和侧链的紧密包围中。K_1OH 的植基链向上绕曲，先和 L_1 的 Gly-29，Asn-30 接触，然后折向下方而与 L_3 的 Ser-93，Leu-94 贴近，末端则和

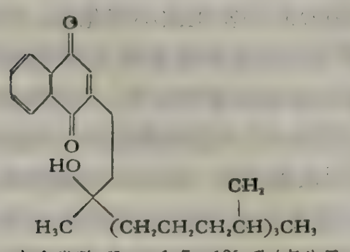

亲合常数 $K_a = 1.7 \times 10^5$ 升/克分子

图 10-12 维生素 K_1OH 的结构式。

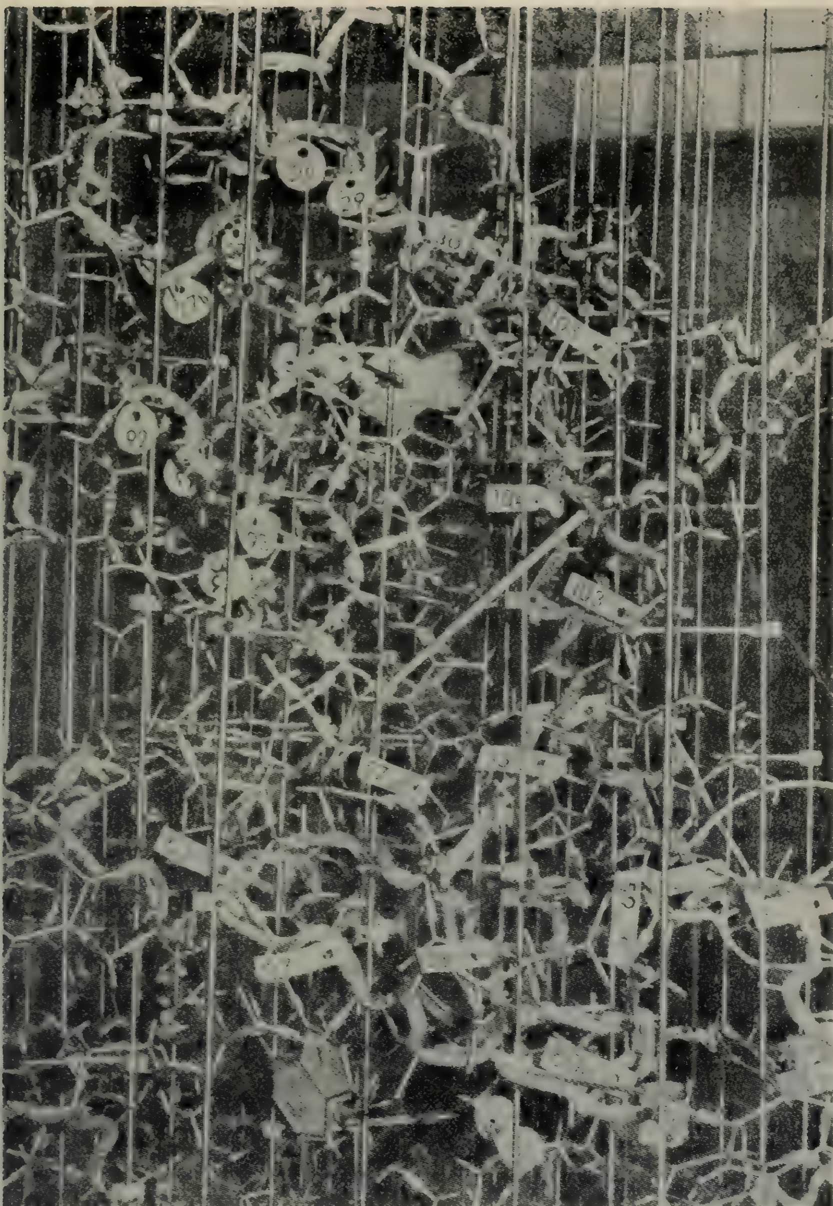


图 10-13 维生素 K_1OH—Fab′NeW 的立体模型，表示维生素 K_1OH (白色)与 L 链(圆标签)和 H 链(长方标签)的高变异残基的空间关系。Fab′New 模型是根据 2.8 Å 分辨率 Fourier 图建造的(据 Amzel 等,1974)。

H 链的 54 (恒定的 Trp)、57 和 67 残基的侧链贴近。由此可见，维生素 K_1OH 结合位点是由分散在 H、L 链上各高变异区域的 10—12 个氨基酸残基共同构成的一个大小为 15×6×6 Å 的浅槽。这里初步确定的构成抗原结合位点的氨基酸残基数目可能是最起码的数目。后来作者们又对抗原结合位点的氨基酸排列的细节作了补充，如图 10-13 和图 10-15 所示。

对小鼠髓细胞瘤蛋白 McPC603 IgA 之 Fab′ 片段和磷酸胆碱半抗原复合物的 3.1 Å 分辨率的 X 射线晶体学分析对 Fab′ 片段的构造，以及半抗原和结合位点的结合方

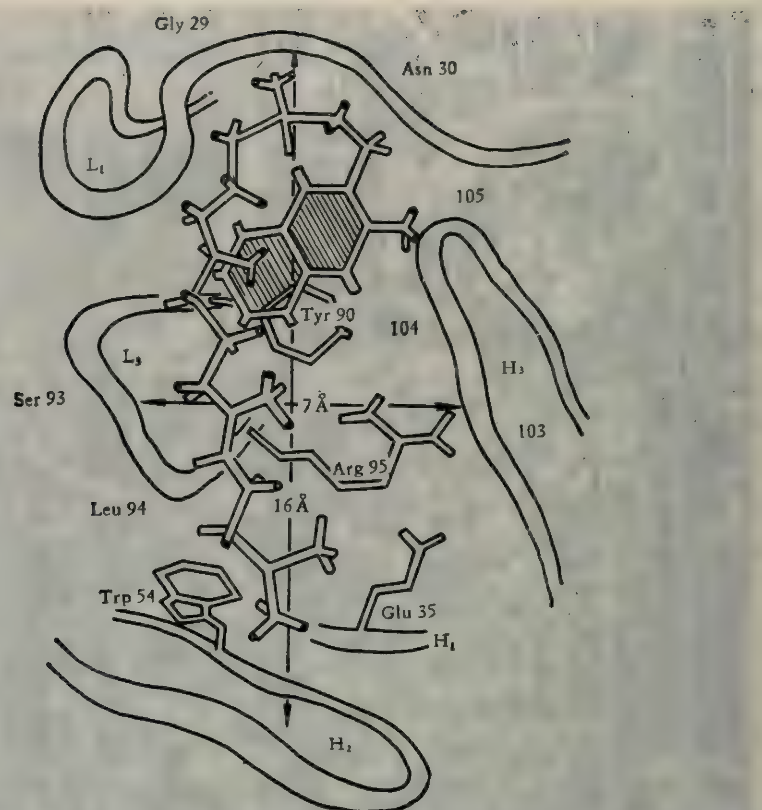


图 10-14 维生素 K_1OH 与 IgGNew 结合位点结合的模式图。L_1 和 L_3 表示L链之第1和第3高变异区大约的位置。H_1, H_2 和 H_3 表示H链的高变异区。L链上的 Tyr90 和 Arg95 位于H和L链共同形成的浅槽的底部。Trp54（人类H链上的恒定残基)和 Glu35 和维生素 K_1OH 的植基末端接触(据 Amzel 等,1974)。

式也提供了很有价值的资料（Segal 等，1974）。

McPC603 蛋白质之 Fab′ 片段的四个功能区（V_H，V_L，C_H^1，C_L）有相似的空间构造。V_H 功能区之α碳原子结构模型如图 10-16 所示。各功能区的基本结构可以看作是由两层彼此平行的肽段往返转折形成的β折叠，包围中心的疏水区而成的“三夹层”构造。如简图 10-17 所示，V 功能区可以看作是由 9 条直的肽段和 8 个折曲构成的，其中 S_1、S_2、S_6 和 S_7 形成 V 功能区的第一层，而 S_3、S_8 和 S_9 形成第二层。两层之间靠位于 S_2 和 S_8 的二硫桥维系。C 功能区只有 7 条直段和 6 个折曲，缺少包含着第 2 高变异区的由 S_4、B_{45} 和 S_5 形成的环。各功能区在外部轮廓上大致相似。和前述人 Fab′（New）各功能区的外部轮廓比较时，发现小鼠和人的 V_L 功能区的外部轮廓之间的相似性比小鼠本身的 V_L 和 V_H 功能区之间的相似性还要大一些。这支持前面谈到过的从一级结构的比较分析得出的结论（第七章，204 页），即 V_H 和 V_L 在进化过程中的歧异很早就发生，可能早于哺乳类起源的时代。

迄今已研究过的几种髓细胞瘤抗体的抗原结合位点的大小、形状和半抗原结合专一性都有显著的不同。如前述，人 Fab′（New）的抗原结合位点是一条浅槽，而小鼠 McPC603 Fab′ 的抗原结合位点则是一个较深的空穴（Segal 等，1974；Padlan 等，1976）。另外一种 Bence-Jones 蛋白质双体（Mcg）的抗原结合位点是一个更深的口

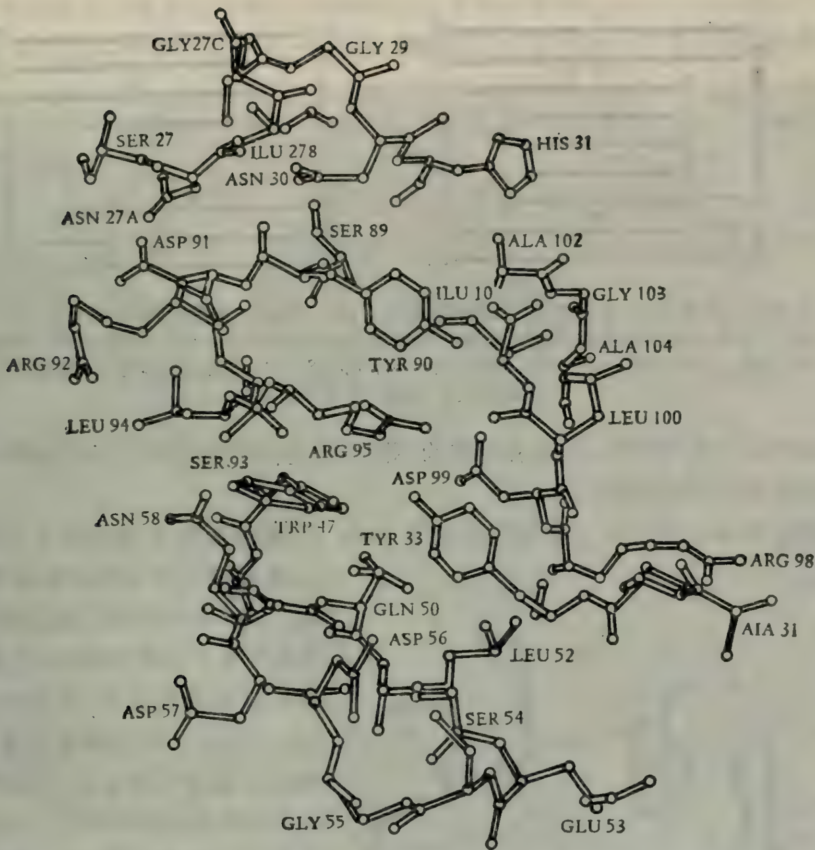


图 10-15 人 IgG New 结合位点的一些氨基酸残基的空间排列图(据 Amzel 等,1974)。

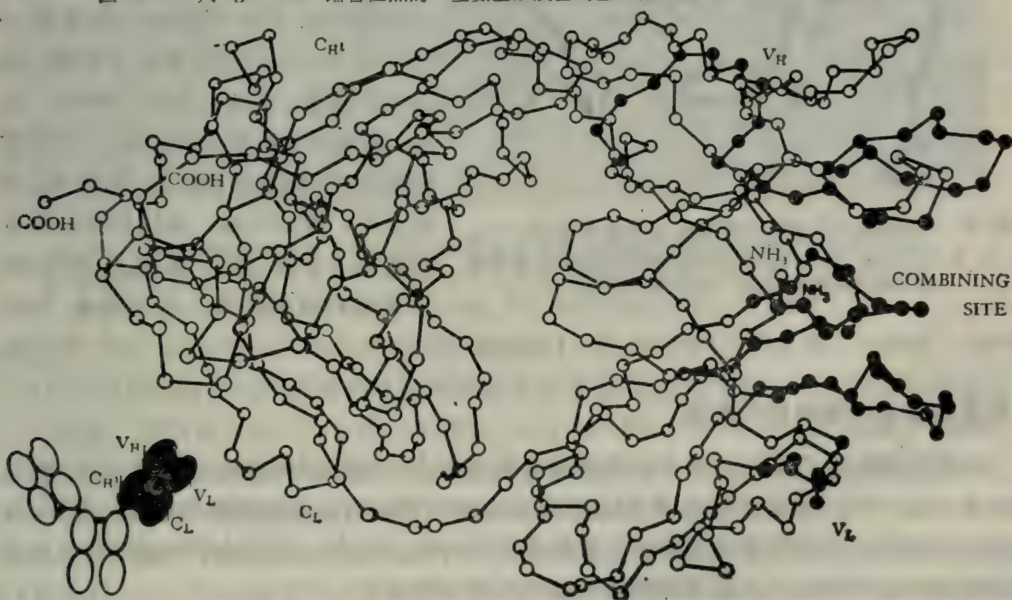


图 10-16 小鼠髓细胞瘤蛋白 McPC603 Fab 片段之碳原子骨架。整个片段分为由重链和轻链的成对的功能区构成的 V 区和 C 区,其间由伸展的"铰链区"连接起来。片段顶端的结合位点是由重链和轻链提供的相邻的高变异的肽环(黑球)构成的(据 Capra 和 Edmundson, 1977)。

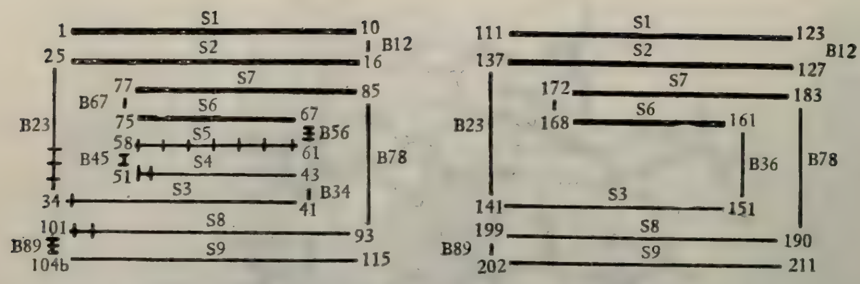


图 10-17 功能区构造的示意图。肽链的直段用 S_1、S_2… 等表示，连结它们的折曲段用 B12, B23… 等表示，细线画的直段表示“三夹层”的一层，粗线画的表示另一层，高变异区用十字表示。左图，V_H；右图，C_L. 在C功能区缺少 S_4、B_{45}、S_5. C功能区的顺序号和V功能区保持同源性(据 Segal 等,1974)。

袋形 (Schiffer 等, 1973)。 这种构造的不同主要是由于高变异肽环的长短(插入或缺失)和排列顺序的不同造成的。

一般假定抗体的抗原结合位点是由位于 Fab N 端表面的 L 链的 3 个高变异肽环和 H 链的 3 个高变异肽环嵌合构成的。在 McPC603 的抗原结合位点只包含 5 个高变异肽环：L 链的第 1、第 3 和 H 链的第 1、第 2 和第 3 肽环 (图 10-18)。L 链的第 2 高变异肽环受到 L 链第 1 高变异大环的空间阻碍不能参加抗原结合位点的构成。和人 Fab′(New) 相比较，McPC603 高变异肽环比 Fab (New) 的要长一些，L_1 和 H_2 肽环要长 3 残基，H_3 要长 2 残基。其次，Fab′(New) 的 L_2 还缺失 7 残基长的肽段。由于这些区别，特别是较长的 L_1 环和 H_3 环的存在，McPC603 的抗原结合位点便成为一个深 12 Å、宽 15 Å 和长 20 Å 的空穴状的构造，而不是像 Fab′ (New) 那样的一条浅槽 (Padlan 等, 1976)。

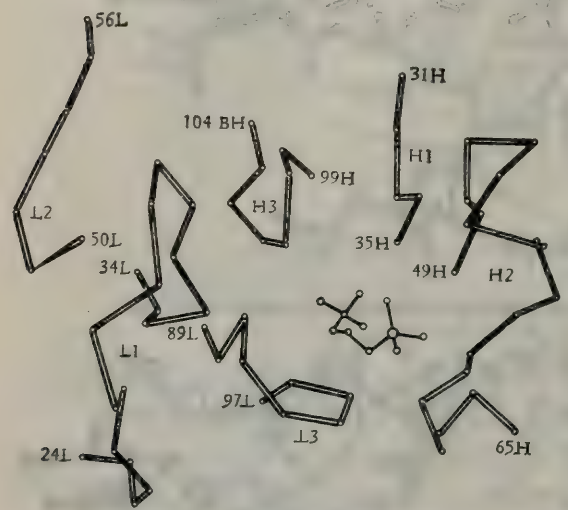


图 10-18 McPC603 IgA 髓细胞瘤蛋白之高变异表面。L_1, L_2, L_3 和 H_1, H_2, H_3 示轻链和重链的高变异区肽环，磷酸胆碱的键用黑线表示(据 Segal 等,1974)。

3. 抗原结合专一性的结构基础

关于抗原结合位点和抗原或半抗原结合的高度专一性的结构基础的问题，从上述抗原结合位点一半抗原复合物的 X 射线晶体学分析结果也可以得到满意的回答。首先，这是依赖于结合位点的形状和抗原决定簇的空间互补性。其次，还依赖于构成结合位点的准确排列的高变异肽环的氨基酸侧链所提供的键的性质。

例如，上述小鼠 McPC603 Fab 的磷酸胆碱结合位点是一个楔形的空穴状构造。磷酸胆碱和结合位点结合时，只占据其空间的一小部分，并且距重链比距轻链更近一些。磷

酸胆碱的三甲基铵部分朝向空穴内部，而磷酸部分靠外一些(图 10-19)。从图上可以看出，磷酸胆碱半抗原和结合位点的专一结合是通过它们在空间互补位置上形成的氢键、静

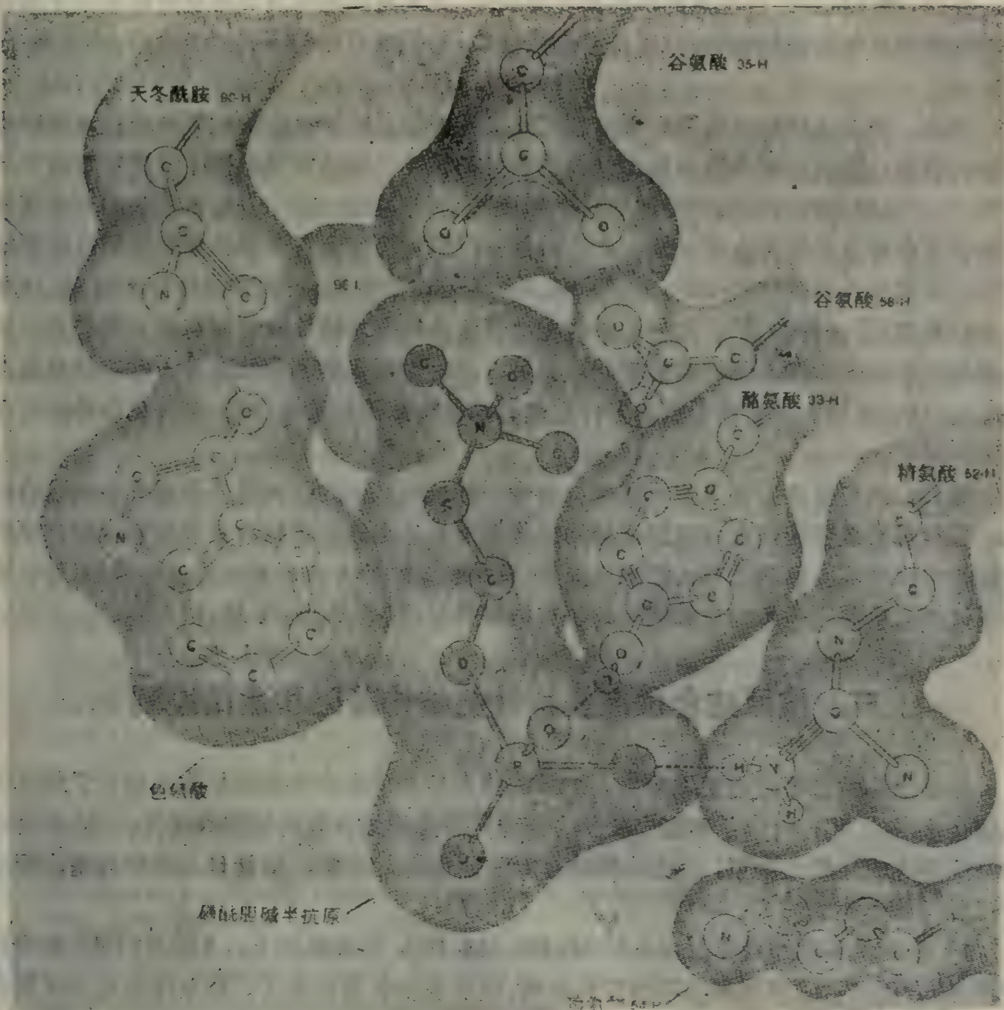


图 10-19　磷酸胆碱半抗原和 McPC603 抗体的结合位点结合的模示图，表示结合位点和半抗原间精确的空间互补关系。构成结合位点的氨基酸侧链通过静电键、氢键和 Van der Waals 相互作用和半抗原结合(据 Capra 和 Edmundson, 1977)。

电键以及 Van der Waals 相互作用来实现的：

1) 半抗原的带负电荷的磷酸基团的氧原子和重链 Tyr-33 (H) 的羟基之间可能形成一个氢键。磷酸基团的另一氧原子和重链 Arg-52 (H) 的胍基也可能形成一个氢键；

2) 磷酸基团的负电荷和重链 Arg-52 (H) 胍基的正电荷之间存在静电相互作用。此外，Lys-54 (H) 的氨基也可能参与和磷酸基团的静电相互作用；

3) 半抗原的胆碱基团的带正电荷的 N 原子靠近 Glu-35 (H) 带负电荷的羧基(相距仅约 5 Å)，并且胆碱基团和重链的 102—103 残基和轻链 91—94 残基之间也可能发生 Van der Waals 相互作用。整个半抗原和 Tyr-33 (H) 的酚环很靠近，也可能存在相互作用。

McPC603 Fab′ 和半抗原结合后，X 射线晶体分析并未观察到抗体蛋白质构象的变化。但这并不能排除在溶液中，抗体和抗原(而不是半抗原)结合时发生变构作用的可能性。其次，组成抗原结合位点的那些高变异肽环，尤其是那些伸展到围绕着抗体分子的水溶液中的氨基酸残基的侧链，似乎是有柔曲性的，它们很可能包围抗原表面的更大的面积。

总之，以上这些研究结果的理论意义是直接证明了关于抗体的抗原结合位点的结构模型的假说，即抗原结合位点是由分散在重链和轻链易变区恒定骨架上分属于各高变异区的 10—20 氨基酸残基共同组成的一个槽形或空穴形构造，其中一些氨基酸的高度变异性提供了各种各样的结合专一性。此外，这一模型还可能回答许多重要的问题：抗原结合专一性和亲合力的结构基础；抗体和抗原结合的键的性质；抗原和抗体结合时，抗体分子有没有发生“变构作用”，这种构象变化被假定是和抗体的效应功能有密切的关系。这些都是正在进一步深入研究的重要问题。可以期待对更多的不同结合专一性的结合位点的结构分析，还将大大有助于抗体多样性起源的结构基础和遗传控制，这一免疫学的基本问题的解决。

最后，还应当指出以上关于抗原结合专一性结构基础的研究都是用髓细胞瘤蛋白作的。显然更为重要的是直接研究诱导的抗体的结合位点的立体结构及其与相应的抗原决定簇的空间关系。目前已有人把家兔抗 P-苯甲酸抗体 Fab 片段初步结晶出来了，可以期待不久将会见到进一步的立体结构的研究结果的报道(据 Roholt 等，1977)。

三、抗原结合位点多样性的结构基础和遗传控制

从以上的讨论可以清楚地看出，抗体的抗原结合位点多样性的结构基础在于组成抗原结合位点的 V_H 和 V_L 高变异肽段的变异所造成的结合位点结构的变化。结合位点的空间形态或性质改变了，对抗原的结合专一性也随之改变。结合位点的结构变化至少有三种可能产生的方式：

1）个别氨基酸的置换。如小鼠 McPC 603 Fab 结构模型上，Arg-52(H) 被 Glu 置换，结合位点总的空间形态不会受到影响，但是电荷性质改变了，结果结合专一性就会发生剧烈的改变；

2）构成抗原结合位点的高变异区存在“插入肽段”或“缺失肽段”。这可能严重影响高变异肽环的折叠而造成整个抗原结合位点的空间形态和大小的改变；

3）V_H 和 V_L 相互作用区域发生氨基酸的置换、肽段的插入或缺失，结果 V_H 和 V_L 两功能区的相对空间位置发生变化，也能改变抗原结合位点总的空间形态，从而导致结合专一性的显著改变。

总之，组成抗原结合位点的 V_H、V_L 功能区的高变异氨基酸残基的置换、肽段的插入或缺失都可能造成结合位点的空间形态和性质的改变，而导致抗原结合专一性的改变。于是，抗体多样性的起源问题便归结到易变区（V）肽链结构的这些变异的遗传控制是以何种特殊的方式实现的。对于人类和动物各种免疫球蛋白一级结构的比较研究的结果，对这一问题提供了一些线索。

如果把所有已知的人类 κ、λ 链和小鼠 κ 链之易变区（V）和不变区（C）的一级

结构加以比较，就可发现一个奇异的现象：不变区的排列顺序表现明显的物种专一性（小鼠和人 κ 链之 107 氨基酸残基中有 36 个物种专一的置换位置）；而易变区却基本上不表现物种专一性，只有少数几个这样的物种专一的位置（Kabat，1967；1970）。Kabat 认为易变区（V）没有物种专一性的事实，提示它的基因在进化过程中没有出现异趋现象，并且也不支持易变区的多样性是受多种多样的基因决定的假说，因为这种遗传机制必然会导致异趋。这说明易变区可能是独立地进化的，并且可能存在特殊的遗传机制。

上面讲过，缺失或插入肽段总是位于高变异区 23—34 和 89—97 位置附近（273页）。根据这一事实，Kabat（1971）提出了一个控制抗原结合位点多样性的特殊遗传机制的假说（Kabat，1971）。他假定抗原结合位点的结合专一性的遗传信息是由相当于这些"插入肽段"的"染色体外基因"（"Episome"）所荷载的。"染色体外基因"的这一段或另一段核苷酸链插入重链或轻链易变区结构基因的 DNA 内。许多能自身繁殖的"染色体外基因"含有大量的核苷酸排列顺序，也就是说大量的决定抗原结合专一性的遗传信息。按照这种插入机制，就可以供给多种多样的结合专一性而无需改变整个抗体分子的基本结构。还可以进一步设想，这种"插入"的过程是在胚胎发生期中进行的。一个免疫活性细胞是多潜能的，可设想为可能具有几个这样的"插入段"，或者全部的"染色体外基因"，而单潜能的免疫活性细胞之结构基因只具有相当于一定抗原结合专一性的"插入段核苷酸顺序"。这种细胞分化过程又可能是在细胞间的相互作用下（如两类淋巴细胞或其亚类之间）或抗原刺激下进行的。

以上关于抗原结合位点多样性的遗传控制的假设目前尚属初步的臆想。此外，还存在其他的假说。我们将在专门的章节再作讨论。

参 考 资 料

抗原结合位点的结构

Amzel, L. M., Poljak, R. J., Saul F., Varga, J. M. and Richards F. F. (1974). The three dimensional structure of a combining region-ligand complex of immunoglobulin new at 3.5Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) 71, 1427.

Birktoft, J. T. (1970). The structure of α-chymotrypsin. *Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B.* **257**, 67.

Brient, B. W. and Nisonoff, A. (1970). Inhibition by specific hapten of the reactions of idiotypic anti-p-azobenzoate antibody with anti-idiotypic antisera *Fed. Proc.* **29**, 773. (Abstract).

Capra, J. D. and Edmundson, A. B. (1977). The antibody combining site. *Scient. Amer.* **236**, 50.

Cathou, R. E. and Werner, T. C. (1970). Hapten stabilization of antibody conformation. *Biochemistry* **9**, 3149.

Fleishman, J. B. (1971). A partial amino acid sequence in the heavy chain of a rabbit antibody to group C Strptococcal. *Biochemistry* **10**, 2753.

Franěk, F. (1971). Affinity labeling by m-nitrobenzenediazonium fluroborate of porcine anti-nitrophenyl antibodies. Position of labe ed tyrosine in the λ-chain. *Europ. J. Biochem.* **19**, 176.

Givol, D. (1973). Structural analysis of the antibody combining site. In: ''Contemporary Topics in Molecular Immunology'', Vol. 2, p. 27, Plenum Press.

Givol, D., Strausbach, P. J., Hurwitz, E., Wilchek, M., Haimovich, J. and Eisen, H. M. (1971). Affinity labeling and cross-linking of the heavy and light chains of myeloma protein. with anti-2,4 dinitrophenyl activity. *Biochemistry* **10**, 3461.

Givol, D, Wilchek, M., H. N. Eisen and Haimovich, J. (1972). Combining sites of myeloma proteins with anti-hapten activity. In: ''Immunoglobulin: cell bound receptors and humoral antibodies.'' Vol. **26**. p. 77. North-Holland.

Goetzl, E. T. and Metzger, H. (1970). Affinity labeling of a mouse myeloma protein which binds nitrophenyl ligands. Kinetics of labeling and isolation of a labeled peptide. *Biochemistry* **9**, 3862.

Haber, E. and Cathou, R. E. (1972). The three dimensional structure of immunoglobulins In: "Immunoglobulins; cell bound receptors and humoral antibodies". Vol. 26, p. 61, North-Holland.

Hartley, B. S. (1970). Homologies in serine proteinases. *Phil. Trans. Roy. Soc. Sed. B.* **257**, 77.

Haimovich, G., Givol. D. and Eisen, H. N. (1970). Affinity labeling of the heavy and light chains of a myeloma protein with anti-2, 4-dinitrophenyl activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **67**, 1656.

Haimovich, J., Eisen, H. N., Hurwitz, E. and Givol, D. (1972). Localization of affinity-labeled residues on the heavy and light chains of two myeloma proteins with anti-hapten activity. *Biochemistry* **11**, 2389.

Kabat, E. A. (1967). A comparison of invarient residues in the variable and constant regions of human K. human L. and Mouse K Bence-Jones proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A). **58**, 229.

Kabat, E. A. (1970). Heterogeniety and structure of antibody-combining sites *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **169**. 43.

Kabat, E. A. (1971). Antigenic determinants and antibody complementarity. In: "New concepts in allergy and clinical immunology", p. 285.

Kabat, E. A. and Wu, T. T. (1971). Attempte to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 382.

Mole, L. E., Jackson, S. A., Porter, R. R. and Wilkinson, J. M. (1971). Allotypically related sequences in the Fd fragment of rabbit immunoglobulin heavy chains. *Biochem. J.* **124**, 301.

Padlen, E. A., Segal, D. M., Spande, T. F., Davies, D. R., Rudikoff, S. and Potter, M. (1973). Structure at 4.5A resolution of a phosphorylcholine-binding Fab. *Nature New Biol.* **245**, 165.

Padlan, E. A., Davies, D. R., Rudikoff, S. and Potter, M. (1976). Structural basis for the specificity of phosphorylcholine-binding immunoglobulins. *Immunochem.* **13**, 945.

Philips, D. C. (1967). The hen egg-white lysozyme molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **57** 484.

Porter, R. R. (1971). The combining sites of antibodies. Harvey Lecture Ser. 65 (1969—1970). p. 157.

Porter, R. R. (1972). The antigen-Binding site of immunoglobulin. In: "Contemporary topics in immunochemistry", ed. by F. P. Inman, Plenum press, Vol. I, p. 145.

Press, E. M., Fleet, G. W. J. and Fisher, C. E. (1971). Affinity labeling of rabbit antibodies with ε-4-azido-2-nitrophenyl lysine. Progress in Immunol., ed B. Amos, Acad. Press, p233.

Roholt, C. A., Radizimski, G., Pressman, D. and Cohen, C. (1977). Crystallization of Fab fragments from an induced antibody. *Immuno. Commun.* **6**, 373.

Rudikoff, S., Potter, M., Segal, D. M., Padlan, E. A. and Davies, D. R. (1972). Crystals of phosphorylcholine-binding Fab-fragments from mouse myeloma proteins: preparation and x-ray analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 3689.

Schiffer, M., Girling, R. L., Ely, K. R. and Edmundson, A. B. (1973). Structure of a λ-type Bence-Jones protein at 3.5A resolution. *Biochemistry* **12**, 4620.

Segal, D. M., Padlan, E. A., Cohen, G. H. Silverten, E. W., Davies, D. R., Rudikoff, S. and Potter, M. (1974). The structure of McPC603 Fab and its hapten complex. In: "Progress in Immunol. II." Vol. 1, Immunochemical aspects, p. 93

Singer, S. J. and Thorpe, N. O. (1968). On the location and structure of the active sites of antibody molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **60**, 1371.

Thorpe, N. O. and Singer, S. J. (1969). The affinity-labeled residues in antibody active sites. II. Nearest-neighbour analysis. *Biochemistry* **8**, 4523.

Wofsy, L. Metzger, H. and Singer, S. J. (1962). Affinity labeling a general method for labeling the active sites of antibody and enzyme molecules. *Biochemistry* **1**, 1031.

Wu, T. T. and Kabat, E. A., (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* **132**, 211.

第三篇　抗原抗体的相互作用及补体

抗原和抗体分子的专一结合是各种体液免疫反应的基础。抗原抗体反应的动力学、热力学以及免疫反应专一性的结构基础，曾经是早期免疫化学研究的中心课题。随着抗体的结合位点的空间构造的阐明以及快速动力学方法的应用，抗体抗原反应的结构基础和动力学等问题的研究又重新活跃起来了。

鉴于各种免疫学测定方法，特别是放射免疫测定和标记抗体示踪法在生物学和医学中的应用愈来愈广泛，简要地介绍这些方法的原理也是必要的。

补体系统是扩大抗原抗体反应的作用，清除外来抗原的主要效应机制。并且在各种免疫病理机制中也起重要的作用。各种补体成分的分子构造及其作用的分子基础，也是分子免疫学研究的一个重要领域。

第十一章　抗原抗体的相互作用

抗原和抗体分子的专一结合是体液免疫反应的基础。免疫化学的历史亦发端于对抗原抗体相互作用的研究。著名的物理化学家 Arrhenius (1907) 在本世纪初期就曾试图用质量作用定律来解释抗毒素和毒素的中和反应。30 年代期间，Heidelberger (1935, 1939) 建立了抗体的定量测定方法，Marrack (1934, 1939) 根据抗原和抗体的多价性概念，提出网格学说 (Lattice theory) 来解释沉淀反应的机制，从而奠定了免疫化学的初步基础。抗原抗体反应动力学和热力学研究，特别是 Pauling, Pressman (1942) 开创的半抗原对抗原抗体反应专一地抑制的研究，对参与免疫反应的分子间力的性质、反应能量以及专一性的结构基础提供了大量精确的知识。和非专一的相互作用不同，抗原抗体相互作用只局限于这些大分子表面的特定部位，即抗原决定簇和抗体的结合位点之间。抗原抗体的结合，其间并没有共价键形成，而是由这些特定部位之间的短程分子力相互作用的结果。这些吸引力只有在极短的距离内才有效。因此，抗原决定簇和抗体的结合位点在空间上必须处于紧密接触状态，才能产生足够的结合力，而使抗原和抗体分子结合在一起。如果抗原决定簇的形状和抗原结合位点相差过大，彼此不能紧密接触，也就不能结合。抗原和抗体反应的专一性依赖于分子间的空间互补性，也就是由于这个原因。

抗原抗体反应专一性的研究具有广泛的生物学意义。许多重要的生命过程，如受精，形态发生过程中细胞间的相互作用，病毒进入易感细胞，以及酶和底物之间，酶和变构调节因子之间的相互作用专一性都是以分子表面互补性为基础的。抗体，特别是抗半抗原抗体可作为研究一般生物接受部位的模型。

应用抗原抗体反应测定抗原或抗体的方法对生物学和医学也有广泛的影响。由于免疫反应的高度专一性和灵敏性可作为鉴别结构非常近似的物质，特别是蛋白质的有力工具，也可用于简单物质在溶液中的构象的研究。放射免疫测定法的建立，对许多种激素 (蛋白质、多肽和甾体) 和某些非激素 (核苷酸、维生素等) 的超微量分析的灵敏度达到毫微克 (ng) 或微微克 (pg) 水平。标记抗体示踪法能在显微和亚显微水平追踪抗原在细胞内的分布。这些方法对于蛋白质化学，内分泌学等学科的发展起了很大的促进作用。最近发展起来的核酸各级结构的免疫化学测定法，尤其是细胞内原位分析，也颇引人注意。

本章先讨论抗原和抗体的沉淀反应，进一步从已知化学结构的半抗原和抗体的相互作用出发，探讨抗原抗体反应的动力学、亲合力和参与反应的分子间力的性质等问题。最后，简略地讨论颗粒抗原的凝集作用以及应用抗原抗体反应测定抗原或抗体的一些方法学问题。

一、抗原抗体不溶性复合物的形成　沉淀反应

（一）沉淀反应和抗体的定量测定　Danyz 效应

一般血清学研究中，抗体的量通常用沉淀反应或凝集反应的效价来近似地表示就足够了。效价是用免疫血清稀释的倍数，$2^1, 2^2, 2^3 \cdots\cdots 2^n$（如 $2^{10}=1,024$，$2^{15}=32,768$）来表示的。这种滴定法有很大的分析误差，如效价为 1,024 时，实际上只有第一位数字是可靠的，第二位数字就可疑了。因此，效价最好用 2 的方次表示，或用 10 的方次并在半对数坐标纸上作图表示。

更为精确的定量分析方法是 M. Heidelberger（1935，1956）建立的。免疫血清所含抗体的定量分析，简单说来，包括三个步骤：1）加同型抗原；2）分离和洗涤沉淀；3）测定沉淀中抗体量。实际操作中却会遇到不少复杂的问题。现将各步骤分述如下：

（1）*加抗原*

正式测定前，应先找出产生最大量沉淀所需之最适抗原量，避免加入过量抗原致使沉淀溶解。如果有大量抗血清供使用时，可在一系列的试管内各放置等量的抗血清，然后在每一试管内加入依次增多的不同量的抗原，选择产生最大沉淀量的一管用于分析。如果可供使用的抗血清的量很少，可先加少量抗原，离心去除产生的沉淀，得到的上清液内再加入少量抗原，多次重复上述手续，直到不再产生沉淀为止。比较上述两种步骤时，发现一次加入最适剂量的抗原所产生的沉淀量比分几次连续加入小量抗原产生的沉淀量要大（表 11-1）。这一现象称为 Danyz 效应。产生这一现象的原因是多方面的。首先，当一次加入最适剂量抗原时，产生的大量沉淀可引起非沉淀抗体或非专一蛋白质共同沉淀，而依次加入小量抗原时，则不致发生共同沉淀。其次，由于抗体的不均一性，当一次加入最适量抗原时，亲合力低的同型抗体可能共同沉淀；而依次加入小量抗原时，它们仍然留在溶液内不被沉淀。在连续沉淀操作过程中，需用抗体来测定沉淀的上清液内有无过剩的抗原残留，或用抗原来测定有无抗体残留，并继续加抗原，直到上清液内

表 11-1　抗豚鼠血红蛋白家兔血清（10ml）经不同方式加入抗原后的沉淀反应

实验	加入抗原量（毫克）	沉淀物组成		
		总重量（毫克）	抗原（毫克）	抗体（计算）*（毫克）
连续加入小量抗原	6.0	37.11	3.0	34.1
	6.0	12.74	3.0	9.7
	3.0	2.74	1.2	1.5
	3.0	微量	—	微量
	18.0	52.59	7.2	45.3
一次加入同量的抗原	18.0	67.31	12.0	55.3

* 抗体量＝沉淀物总量－沉淀抗原量。沉淀中抗原量是将沉淀溶解于稀 NaOH 溶液中后，用比色法测定的。（据 Haurowitz, 1968）。

用以上两种方法测定均无阳性反应时为止。通常假定这时上清液内已经没有抗原和抗体了。然而，这是不完全正确的。因为沉淀可能有一定程度的解离，上清液内总会有微量的抗体或抗原存在。当测试抗体的量很小时，就可能严重地影响结果。

抗原和抗体的结合是很迅速的。但是，抗原抗体复合物聚集形成沉淀却是一个很缓慢的过程。由于增高温度可以加快沉淀形成的速度，通常将抗原抗体复合物在37°C条件下静置30—120分钟。然后冷却到0°C，再放在冰箱内，过几天就会产生最大量的沉淀。经过这样处理后，回复到室温，也较不易解离。

(2) 抗原抗体复合物的分离

以往认为用生理盐水或缓冲液洗涤时，沉淀的溶解是可以忽略不计的，并不影响沉淀内抗原抗体的比例。然而，用同位素标记抗原或抗体的实验证明沉淀物（AgxAby）会发生解离，而失去一部分抗体：

$$AgxAby \rightleftharpoons AgxAb(y-z)+zAb$$

为了去除非专一的γ球蛋白，不能不洗涤沉淀。因此应尽量用小量体积的盐水或缓冲液洗涤，并严格的保持相同的操作条件。

(3) 沉淀的分析

由于技术上的困难，沉淀内的抗体量不是把抗体从抗原抗体复合物中分离出来后直接测定的，而是从测定整个沉淀的量间接推算出来的。沉淀的定量测定法有以下几种：

1）微量克氏定氮法；

2）Folin 和 Ciocalteu 法测蛋白质量。

如抗原为不含氮的多醣，用上述方法测得的沉淀含氮量或蛋白质量，即为抗体的量。

3）比色分析　如抗原为有色物质（血红蛋白、偶氮蛋白质等）可直接用比色法测定沉淀中的抗原量，并根据沉淀的总蛋白量由此推算出抗体量（抗体量=沉淀总蛋白量-抗原量）；

4）放射性同位素标记法　用放射性同位素（如 ^{131}I，^{35}S）标记抗原。计数沉淀的

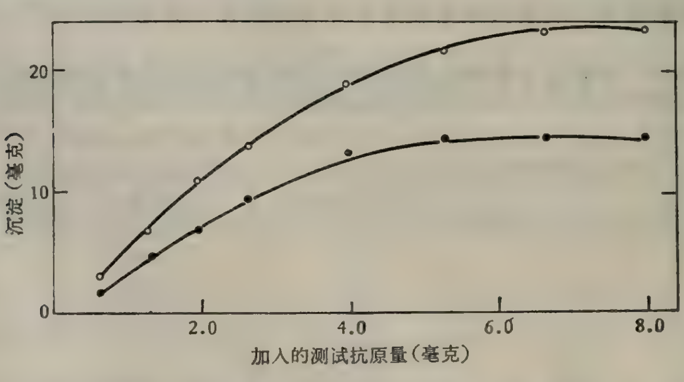


图 11-1　抗马血清球蛋白-p-偶氮苯砷酸家兔血清中半抗原专一抗体的测定。图中表示加入小量测试抗原(家兔血清球蛋白-p-偶氮苯砷酸，含2.8%砷)到10ml 抗血清中。（-○-）每次加抗原后产生的总沉淀量；（-●-）总沉淀中的抗原量。图中各点的数值是逐次分析所得的数值的和（据 Haurowitz, 1968）。

放射性量表示抗原的量。抗原抗体复合物能被50%饱和的硫酸铵沉淀。如果抗原在这一条件下不沉淀时，就可以用这一方法把和抗体结合的抗原与游离的抗原分开。沉淀物经50%饱和硫酸铵洗涤去除游离抗原后，计数放射性量就可以测出抗原含量。这是目前最灵敏的方法，我们在以后还要讲到。

实际操作时，最好在一定量的抗体溶液内，逐步加入少量抗原，分别地测定各沉淀内抗原或抗体的含量，并作图(图11-1)。

（二）沉淀反应的机制

免疫学初期的研究已经发现，毒素和抗毒素的中和反应可能按下列反应式产生可逆的沉淀：

$$毒素+抗毒素 \rightleftharpoons 毒素抗毒素复合物$$

这一反应表面上似乎和酸碱中和反应相似，Arrhenius（1907）因而试图根据质量作用定律来求出该免疫反应的平衡常数，但未获成功。这主要是由于不了解参与免疫反应的抗原和抗体都是大分子，可能具有“多价性”。

后来的研究表明，沉淀抗体是双价或多价的(具有两个以上的抗原接受位点)，而单价抗体(如Fab)则不能产生沉淀，只能形成可溶性复合物。另一方面，天然蛋白质或多醣大分子具有许多决定簇，但具体的数目却不易测定。为了研究方便起见，有人在一个抗原大分子上连结已知数目的半抗原，发现只有当半抗原的数目在2以上时，才能和相应的抗体产生沉淀反应。因此，抗原和抗体的多价性是形成沉淀的必要条件。Marrack（1934）根据抗原抗体多价性概念，以及沉淀内抗原抗体组成的定量测定，提出了网格学说来解释沉淀反应的机制。

1. 网格学说（Lattice theory）

这一学说是Marrack在1934年提出，并经过Heidelberger，Pauling与其他许多学者的修改。基本的概念是：具有两价以上的抗体和多价的抗原相互作用，连接成一个大的网格样聚集物，而发生沉淀。

为了验证这一假说，必须先对抗体抗原的结合反应作定量的测定。这方面的工作是由Heidelberger开创的。他最初是用III型肺炎球菌荚膜多糖作抗原。这种抗原本身不含氮，因此大大减少了对抗原抗体沉淀物组成分析的复杂性。在一定量的抗血清中，逐步增加加入的抗原量。待反应完全后，洗涤去除未反应物，再用微量克氏定氮法测定沉淀中的总氮量。由于抗原不含氮，沉淀中所有的氮都来自抗体。对于一个蛋白质抗原，沉淀中抗体的测定就需要从洗涤过的沉淀的总氮量中减除抗原的量。如前所述，为了使抗原能和抗体区别开来，通常是用化学的或放射性同位素标记抗原，从而测出抗原的量。用这样的方法可得出如图11-2所示的沉淀量曲线。这一曲线显而易见的特点是，随着加入的抗原量的增加，沉淀的抗体量逐渐增加到最大值，然后相当迅速地下降，结果在抗原极端过量时，反而不能形成沉淀。

从上图可见，沉淀量曲线可分成几个区域。OP区（抗体过剩区），抗原完全被沉淀，上清液内可测出游离抗体。PB区(平衡区)，上清液内既无可测出的抗原，亦无抗体。

超过 B 点，便进入到抗原过剩区，上清液内可测出游离抗原。抗原若再继续增加，常常完全抑制了沉淀的形成。事实上，当抗原略微过量时，可得到抗原抗体复合物的最大沉淀量。

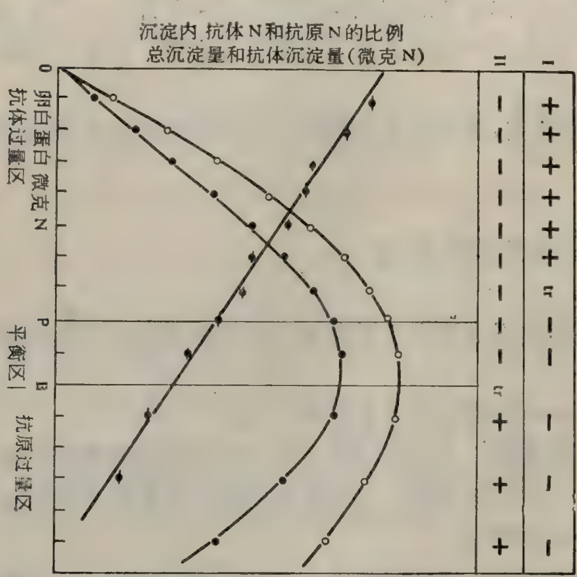


图 11-2　卵白蛋白和抗卵白蛋白沉淀反应的定量过程。横坐标：加入抗原量用微克 N 表示。(-○-) 沉淀的总 N 量；(-●-)沉淀中抗体N量；(-◆-) 沉淀中抗体N和抗原N的比值。分离去除沉淀后上清液测定的结果：(I) 抗体；(II)抗原(卵白蛋白) (tr)痕量。(据 Humphrey 和 White, 1964)。

抗原抗体反应的最适比例。从上图还可以看出，沉淀量随反应溶液中抗原抗体的比例的改变而变化。在平衡区偏右侧处，能最迅速地产生最大量的沉淀。此时，抗原抗体的比例称为最适比例。对于一定的抗原和抗体系统，不论两者的稀释度如何，此比值是固定不变的。在抗体过剩区，沉淀中这一成分的含量要相对地多。反之亦然。

按照网格学说，如图 11-3，11-4 所示，假设抗体为 2 价，抗原的价数 = N。当抗体大量过剩时，抗原所有的价均被过量的抗体饱和，结果产生可溶性复合物。当 Ab/Ag 比值在 N/2 附近时，形成大的复合物而发生沉淀的机会愈增加。过此，抗原大量过剩时，抗体又被过量的抗原饱和，结果仍产生可溶性复合物。

2. 抗原抗体复合物形成的分子机制　电子显微镜观察

按照网格学说可以推论：一个双价抗体显然不能和两个以上的单价抗原(或半抗原)结合，并且产生的复合物是可溶的。当抗原（或半抗原）为 2 价时，就能产生直链的

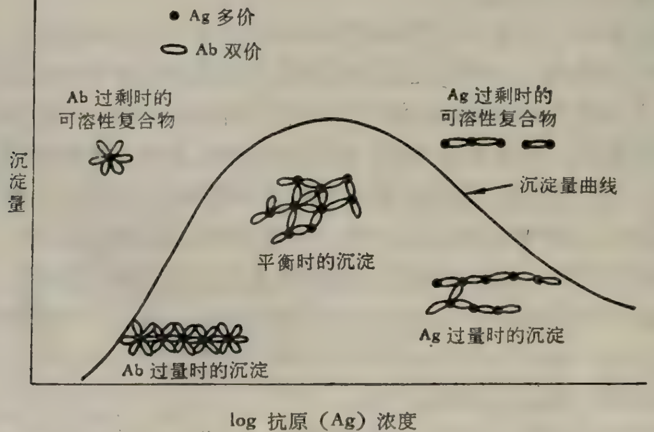


图 11-3　在一定量抗体内加入不同抗原量时沉淀量的曲线。示在抗体过剩、平衡点和抗原过剩时，可溶性复合物和沉淀的组成 (据 Pauling, 1940)。

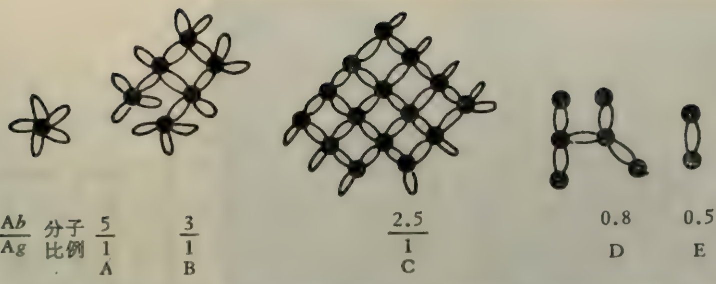
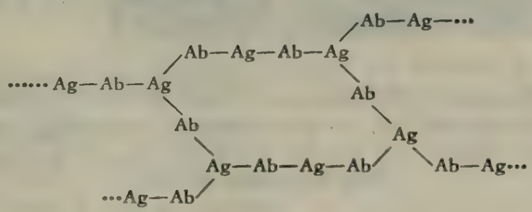


图 11-4 按照网格假说，抗原抗体复合物内抗原(●)和抗体(○)分子假定的排列图：(A) 抗体极度过剩，抗原的所有价(5)均被过量的抗体所饱和。(B) 抗体略微过量。(C) "最适比例"。(D) 抗原过量。(E)抗原极度过量，抗体双价均被饱和（据 Humphrey 和 White, 1964)。

……Ag-Ab-Ag-Ab……或环形的复合物。如果抗原有三个或三个以上的决定簇时，就可能产生叉链，交错地形成立体的网格结构：



因而易于沉淀。在有过量的抗原(或半抗原)时，免疫复合物沉淀就又溶解，这是由于加入的抗原(或半抗原)分子和网格中结合的抗原分子竞争双价的抗体分子，而将后者转变成可溶性复合物（Ag-Ab-Ag）的缘故。

近年来对免疫复合物的电子显微镜观察，有力地证实了上述抗原抗体复合物形成分子机制的推论。如第七章已讲过的，当"Y"字形的 IgG 双价抗体分子与双决定簇的半抗原结合时，电镜下可观察到多角形或环形的构造。如果经过巯基乙醇处理，抗体被解离为单价的半分子后，沉淀就溶解了（Feinstein 和 Rowe，1965）。小鼠 Ig A 双体和双功能基半抗原（bis-DNP-glycyl-lysine）可形成梯形的网格构造。由于这种构造，任何连接处断开后，又可能相当迅速地恢复，因而复合物能保持稳定。IgA 单体和半抗原只能形成可溶性复合物，电镜下呈螺旋浆的形状（Munn，等，1971）（图 11-5）。

3. 沉淀反应的数学公式

许多人曾经试图用数学公式表示抗原抗体反应中，沉淀量及 Ab/Ag 比值与上清液内抗原和抗体的量的关系。这类计算大多数都假定抗原和同型家兔抗体形成的沉淀在抗体过剩时是不溶的。另一假定是所有抗体的结合位点是相同的，所有抗原的决定簇也是相同的。事实上，这两个假定都过于简单化了，在实验上都是没有根据的。从前述表 11-1 可看出，既使对于家兔抗体，在抗体过剩区也有可溶性抗原抗体复合物形成。其次，早已知道一般的抗体是对抗原决定簇的亲合力有很大差别的、非常不均一的混合分子群。由于这种复杂性，迄今提出的所有的方程式都不能满意地描述从抗体过剩区到抗原过剩区整个抗原抗体反应范围内的实验结果。同时，对家兔抗体提出的方程式也不适用于马抗体，因为后者在抗体过剩区也不产生沉淀。

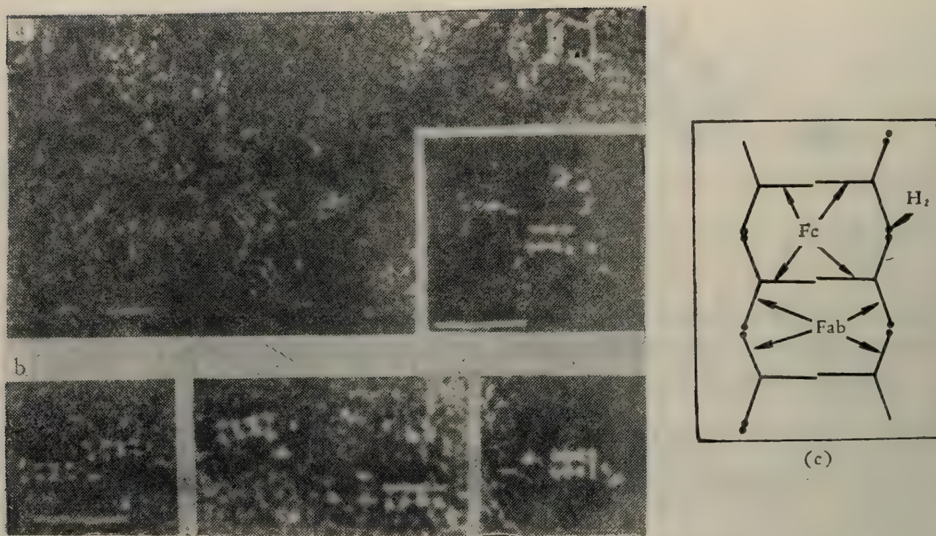


图 11-5 小鼠 MOPC315 IgA 双体和双价半抗原(bis-DNP-glycyl-lysine)形成的"梯形"抗原抗体复合物的电子显微镜图象 (a)，以及还原的和烷基化的 IgA 单体形成的类似的抗原抗 体 复合物 (b)。(a) 图内的插图示一个"梯形"构造，其四角有突起伸出。横线长度 =200 Å。 (c) 双体 IgA 和双价半抗原形成的"梯形"免疫复合物构造的示意图(据 Munn 等,1971)。

(1) Heidelberger 和 Kendell 方程式

Heidelberger 和 Kendell (1935) 对于一定的抗原抗体系统(如卵白蛋白 Ea 和家兔抗卵白蛋白抗体 Anti-Ea)，在一定量的抗血清中依次增加加入的抗原量 (Ag *N*) 后，相应地测定每次沉淀量及抗体抗原比值 (Ab*N* /Ag*N*)。在抗体过剩区内，将 Ab*N* /Ag*N* 比值对所加入的抗原量作图，则得到一条直线。这条直线将遵守下列方程式：

$$\frac{\mathrm{Ab}Npptd}{x} = a - \mathrm{b}x \qquad ①$$

$$或\quad \mathrm{Ab}Npptd = ax - bx^2 \qquad ②$$

其中 x = 所加入抗原量 (Ag*N*)。 这一方程式表示：从抗体过剩区到最大沉淀点之间，加入的抗原量 (x) 与沉淀的抗体 (Ab*N pptd.*) 之间的关系。参数 a 为直线在 y 轴上的截距，b 为直线的斜率。 对于不同的抗原抗体系统，参数 a,b 的值不同，需用实验求得。(如在家兔 Ea-Anti-Ea 系统中，$a = 15.8$，$b = 83$，代入②式，可得到适用于该系统的经验方程式 $\mathrm{Ab}Npptd. = 15.8x - 83x^2$)。$a$ 依赖于抗体的特性，b 依赖于抗体特性及存在的抗体量。

由于在抗体过剩区沉淀也不能完全，加入的抗原量总是超过沉淀物中的抗原量。根据实验数据作出图，在某些系统往往和直线略有偏离。因此，他们又提出一个更适合于这些系统的经验方程式：

$$\mathrm{Ab}Npptd. = cx - dx^{3/2} \qquad ③$$

其中参数 c，d，可从 Ab*N* /Ag*N* 对 $\sqrt{x}$ 作图求出。

他们又根据质量作用定律，进一步推导出一个理论方程式：

$$\text{Ab}N\,pptd. = (2R)\,x - \left(\frac{R^2}{A}\right)x^2 \qquad ④$$

其中，常数 A = 平衡点(平衡区的中点)上沉淀的抗体量（AbN），

R = 同一点上，沉淀内 AbN /AgN 比值。

与②式比较，可见 $a = 2R$，$b = (R^2/A)$。由此即可算出一个未知血清中抗体的总含量。例如，在上述 Ea-Anti Ea 系统中，已知 $a = 15.8$，$b = 83$。由此可算出 $R = a/2 = 7.9$，$A = R^2/b = 0.75$。这和实验得到的数据是相近的。

(2) 吸附方程式

由于大多数抗原是“多价的”大分子，能以不同比例和多个双价抗体分子结合。因此，可以把抗原抗体反应看作抗体被抗原吸附的反应，而使用 Langmuir 吸附方程式来近似地描述此过程。

在抗原过剩区，此方程式可写作：

$$r = nK(G)/[1 + K(G)] \qquad ⑤$$

其中，r' = 沉淀物内抗原对抗体的比值

n = 单位抗体的结合部位的数目

K = 抗体和抗原决定簇之间内在的结合常数

G = 平衡时上清液内游离抗原浓度

在毒素抗毒素系统中，这一方程式能够很好地符合实测的数据，并能预测沉淀的组成。

(3) Goldberg 方程式

Goldberg (1952) 将关于计算叉链高聚物中分子大小分布的方法应用到抗原抗体系统。假定抗原是多价的，抗体是双价的。并且还假定抗原抗体反应过程中不断地形成直链和叉链小的聚集物，直到此系统达到一个临界点为止。此时，该系统从主要是由小的聚集物组成，转变为由数量相当少的大聚集物组成，于是开始出现沉淀。此外，还假定聚集物内的反应不形成环状构造，并且未起反应的结合部位和其他的结合部位的反应能力相同，不论和它们相连的聚集物的形状和大小如何。

根据这些假定，Goldberg 发现 m_{ijk}（由 i 个双价抗体分子，j 个单价抗体分子和 k 个抗原分子所组成的聚集物的数目）为：

$$m_{ijk} = fG\,\frac{(fk-k)!}{(fk-2k+2-q-j)!\,k!\,q!\,j!}\,r^{k-1}p^{k+i-1} \times p^{k+i+j-1}(1-p)^{fk-k-i-j+1}(1-\rho p r)^{i-k+1}(1-\rho) \qquad ⑥$$

并设 $i = k - 1 + q$

$o \leqslant q - j \leqslant fk - 2k + 2$

其中，G = 系统内抗原分子的数目，

f = 每一个抗原分子有效的反应部位(决定簇)的数目，

q = 一聚集物上未结合的抗体结合部位的数目，

p = 系统内已起反应的抗原决定簇的比值(即反应程度)，

ρ = 系统内属于双价抗体分子的抗体结合部位的比值，

A = 系统内双价抗体分子数目，

$r = fG/2A$，$S = fG/D$，此处 D = 单价抗体分子的数目。

根据此方程式，从抗原抗体混合比例就可推算出沉淀的组成。此方程式的优点在于不含有为了适合经验数据的需要而引入的可调节的参数。所计算出的抗体抗原比值适合于由抗体含量改变而使组成起变化的所有系统。并且提供了一个决定在抗原过剩区和抗体过剩区抑制沉淀的极限的方法。缺点是计算太复杂。

总之，以上各方程式都需要作一些过于简化的假定，这些假定或多或少地都不符合抗原抗体反应系统的复杂性。因此，这些方程式各有其限制性。目前还没有一个方程式能够完满地表示从抗体过剩区到抗原过剩区全部沉淀反应的过程。

(4) 计算机模拟模型

近来有人建立了大分子抗原和 IgG 抗体相互作用的计算机模拟模型（Steensgaard 等，1975）。假定大分子抗原的价数为 f，和一个双价抗体反应的结果决定于抗原和抗体的浓度，并且在这一系统内所有相互作用的亲合常数是相同的。此外，同 Goldberg 方程一样，还假定聚集物内不形成环状复合物。形成的一系列抗原抗体复合物（Agn-Abm）可用三角形反应简图表示(图 11-6)。简图向右延伸可包含所有可能出现的 Ag-Ab 复合物。

简图中个别过程可用二级动力学反应公式表示如下：

$$\frac{d[\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}m]}{dt} = K_+[\mathrm{Ag}][\mathrm{Ag}_{n-1}\mathrm{Ab}m] - K_-[\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}m] \quad (1)$$

$$\frac{d[\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}m]}{dt} = K_+[\mathrm{Ab}][\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}_{m-1}] - K_-[\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}m] \quad (2)$$

$$\frac{d[\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}m]}{dt} = K_+[\mathrm{AgAb}][\mathrm{Ag}_{n-1}\mathrm{Ab}_{m-1}] - K_-[\mathrm{Ag}n\mathrm{Ab}m] \quad (3)$$

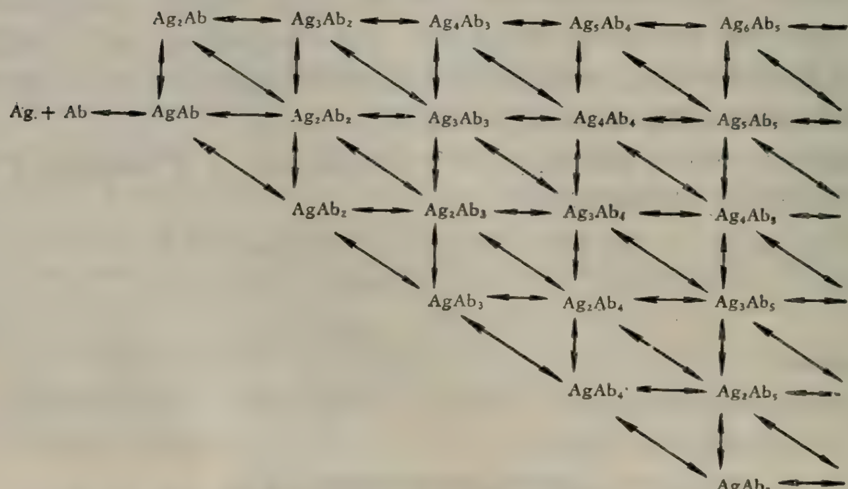


图 11-6　大分子抗原（Ag）和相应的抗体 IgG(Ab) 相互作用的反应图式。箭头表示抗原抗体复合物增长的方式。垂直箭头表示一个复合物增加一个 Ag 分子。斜箭头表示增加一个 Ab 分子。水平箭头表示增加一个 AgAb 复合物(据 Steensgaard，1975)。

表 11-2 测试抗原的决定簇数目和免疫复合物的沉淀量和分子组成的关系

测试抗原	1	2	3	4	5	6
As 决定簇数目/分子	170	130	32	16	11	3
最大沉淀量（mg）	17.5	22.0	22.8	16.2	6.8	痕量
沉淀内抗原量（μg）	52	72	40	23	9	痕量
沉淀内抗原 %	2.7	3.6	6.4	9.3	13.4	?

（据 Haurowitz, 1968）。

表 11-3 家兔抗血清专一沉淀的分子组成

抗原	分子量	抗体/抗原的克分子比值		
		抗体过剩区	平衡区	
			抗体过剩侧	抗原过剩侧
溶菌酶	1.5×10^4	2		
卵白蛋白	4.2×10^4	5	3	2.5
人血清白蛋白	6.7×10^4	6	4	3
人丙种球蛋白	1.6×10^5	7	4.5	4.5
马铁蛋白原	4.65×10^5	26	14	7
甲状腺球蛋白	7.0×10^5	40	14	10
田螺血兰朊	6.63×10^6		120	83
TMV	40×10^6	650	130	70

（据 Haurowitz, 1968）。

其中方括号内为复合物的实际浓度。K_+为亲合速度常数，K_-为解离速度常数。相应的亲合常数 $K=K_+/K_-$。

根据演算结果，在抗原过剩时只存在少数抗原成分居多的复合物。达到或接近平衡点时，可能出现许多相当小的复合物，而抗体过剩时，复合物最可能以 $AgAb_n$ 形式存在。假定沉淀是由抗体过剩的复合物组成的，就可以求出沉淀曲线。根据计算得出的沉淀曲线和实验得出的是很符合的。

4. 影响免疫复合物组成的因素

免疫复合物的组成受到抗原和抗体分子本身的性质以及反应环境等多方面的影响：

(1) 抗原决定簇数目和分子量

抗原的结构（分子量、决定簇数目、种类和排列等）都可能影响免疫复合物的组成。沉淀物内抗原抗体分子的比例依赖于抗原的价数，即每一个抗原分子上决定簇的数目。家兔经过马血清球蛋白（含 14 个偶氮苯砷酸基团，分子量 = 160,000）免疫后，得到的抗血清，当用每分子含有 3—160 个偶氮苯砷酸基团的家兔血清球蛋白作为测试抗原作沉淀反应时，所产生的总沉淀量和沉淀的组成均随测试抗原的决定簇数目而改变（表 11-2）。对于天然蛋白质抗原，当抗原分子量逐渐增加时（从 1.5×10^4 到 40×10^6），抗原表面决

定簇数目随分子表面积的增加而增加，沉淀内 Ab/Ag 克分子比值也随之增加(表 11-3)。

抗原分子的结构，随所处的理化状态不同而有改变时，也能产生影响。如血蓝朊-抗血蓝朊系统中，当溶液 pH 增高时，沉淀 Ab/Ag 克分子比值也增加。这是由于血蓝朊分子在 pH 8.8 时，解离成亚基，一些原来被掩盖于分子内部的决定簇暴露到表面，增加了和抗体分子结合的机会。当重新酸化到 pH 6.5 时，亚基又重新聚合。因此，沉淀 Ab/Ag 克分子比值不仅依赖于抗原的分子量，而且依赖于它所处的物理化学状态。

与克分子比值不同，Ab/Ag 的重量比值则和抗原的分子量成反比。这是因为抗体分子只能和抗原分子表面起反应，而"表面积/重量"比值，随分子量增加而减少。(如对于球形的颗粒抗原，半径增加 n 倍时，体积增加 n^3 倍，而面积只增加 n^2 倍)。如果将颗粒抗原的大小，从分子范围(约 10^2 Å) 增加到细胞范围 (约 10μ 或 10^5 Å)时，$n=10^5/10^2=10^3$，结果 Ab/Ag 的重量比值大大减小到约 10^{-3}。因此，沉淀反应不能测出的微量抗体，当把少数抗原分子结合到细胞表面上就足以引起细胞的凝集反应。被动血凝法就是根据这一原理，可以测出<1 微克的抗体。

(2) 抗体的类别和来源

抗原抗体复合物的溶解度随抗体的类别和来源而不同。虽然所有动物的 IgG 抗体产生的复合物，在抗原或半抗原过剩时都能溶解，而一些 γM 抗体产生的沉淀则不能溶解。

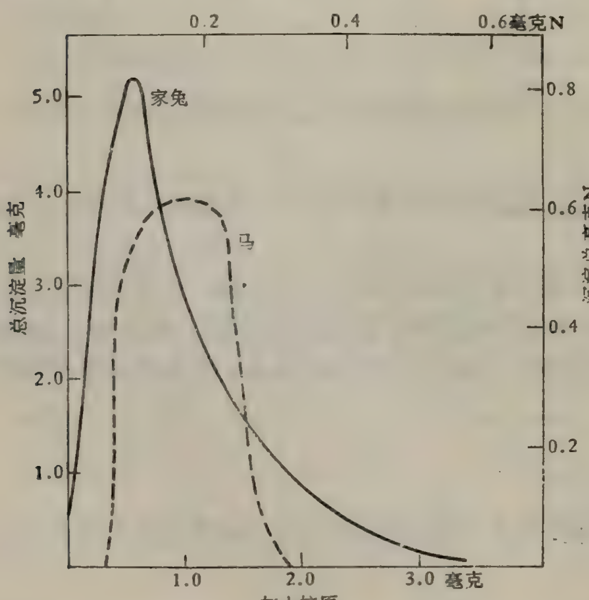


图 11-7 家兔和马抗体与同型抗原的沉淀曲线。抗体过剩区，家兔抗血清有沉淀形成，马血清则无沉淀形成 (据 Haurowitz, 1964)。

家兔等实验动物的抗体 (γG) 产生的沉淀，在抗体过剩时，溶解度很小。而马抗血清对蛋白质抗原产生的沉淀，在抗体过剩时，却易于溶解(图 11-7)。这种溶解度不同的原因还不清楚。有人推测可能和两种抗体的结合部位在分子上的排列位置不同有关系。如果抗体分子的两个结合部位很靠近，一个结合部位和抗原结合就可能在空间上妨碍另一结合部位的结合，从而干扰网格的形成。这类抗体从结构上讲是双价的，而实际上只能起单价的作用。因此，在抗体过剩时易形成可溶的抗原抗体复合物。

此外，动物免疫时程的长短，对抗血清的沉淀行为也有影响。免疫时程长的血清的平衡区比短期免疫的血清的平衡区宽。这反映了免疫过程中，抗体分子组成(类别，亲合力等)的变迁。

(3) 离子强度

抗原抗体复合物的沉淀的溶解度，在一定程度上依赖反应溶液的离子强度。家兔免疫血清产生的沉淀，通常用等渗盐水（0.15 *M* NaCl）或 PBS 洗涤，较低或较高的离子强度都可能减少沉淀物的形成。这似乎不是由于沉淀的溶解度的增加，而是由于反应物之间平衡点的移动，结果同量的抗原只能和较小量的抗体结合。这种盐效应常常被用来解离沉淀，以得到提纯的抗体。有人研究了各种卤素和硫氰基的钾盐对卵白蛋白——家兔抗体系统的影响，发现抑制沉淀形成的能力：$CNS^- > I^- > Br^- > Cl^- > F$，似乎和这些离子的水合能成反比。这可能是由于水和能的减少使这些离子更易于和蛋白质结合的缘故。

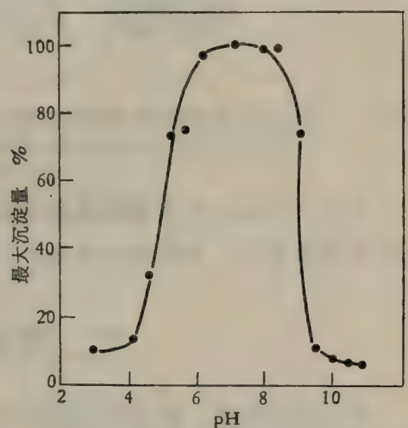


图 11-8 pH 对卵白蛋白抗卵白蛋白之沉淀反应的影响(据 Boyd，1962)。

鸟类抗血清很特别，在生理盐水中的沉淀量反而要比在高浓度盐水（8% 或 1.36 *M* NaCl）中的少。

(4) pH

对于卵白蛋白家兔抗体系统，在 pH 6.4 和 7.8 之间，沉淀量没有差别，超过此 pH 范围时，沉淀便趋向于解离(图 11-8)。毒素和抗毒素中和时，反应溶液的 pH 也没有可测出的变化。沉淀反应抑制区形成的可溶性复合物，在 pH 7.5 和 4.6 之间不受影响，pH 再降低就会发生解离。

5. 沉淀物的解离

沉淀反应中，沉淀和上清液中的反应物处于平衡状态，当用盐水洗涤时，沉淀可能解离。

抗原抗体的沉淀物（其中抗原或抗体经放射性同位素标记）用 0.9% 盐水重复洗涤时，发现抗体有一定的损失，不过损失量一次比一次减少，而抗原只有极微量的损失。因此，免疫复合物的解离可能是按照下列公式进行的：

$$\mathrm{AgAb}n\ (\mathrm{ppt}) \rightleftharpoons \mathrm{AgAb}\,n-m\ (\mathrm{ppt}) + m\ \mathrm{Ab}\ (\mathrm{solu.})$$

由于上述溶液可以看作是几乎不溶的 AgAb 复合物的饱和溶液，AgAb 的浓度维持恒定。因此，此反应的平衡常数 $K=[\mathrm{Ab}]$，即可用溶解的抗体的克分子浓度表示。平衡常数 K 相当于解离常数 Kd，其单位为 (moles/liter)；逆反应的平衡常数相当于结合常数 $Ka=1/Kd$，其单位为 (升/克分子)。

抗原抗体沉淀在高盐浓度、低 pH 以及半抗原过剩均可能解离。在牛血清白蛋白和家兔抗牛血清白蛋白系统，用超速离心法观察不同 pH 条件下 AgAb 混合物的沉降行为，发现当 pH 降低时，游离的抗体愈来愈增加，而 AgAb 复合物愈减少(图 11-9)。这种变化显然是 pH 的函数，并且是完全可逆的。这提示静电力可能参与抗原抗体的结合。

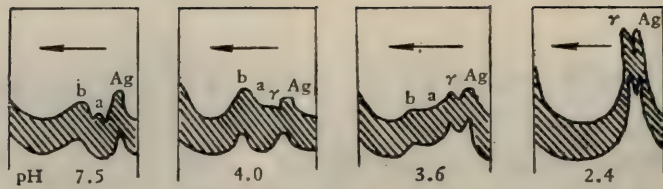


图 11-9 牛血清白蛋白和其抗体的混合物在不同 pH 时的超离心沉降图形。(Ag)=抗原 (Ab)=γ=抗体 (a)=Ag_2Ab 复合物 (b)=Ag_3Ab_2 复合物。<pH4.5 时，出现游离抗体 (γ)，复合物同时减少 (据 Singer, 1957)。

此外，高浓度的尿素和洗涤剂(硫酸十二烷基钠等)也可能引起解离。此时，抗体从沉淀物释放出来，可能是由于构象的变化，而使抗原和抗体之间亲合力降低的缘故。

二、可溶性抗原抗体复合物

在抗原过剩区，家兔或马抗体都能形成可溶性免疫复合物。抗原和单价抗体结合时，则只能形成可溶性复合物。在抗原过剩区，可溶性复合物的存在可由超离心场中 AgAb 混合物的沉降行为显示出来(参看图 11-9)：离心场内出现两个峰，一为游离抗原，一为抗原抗体复合物。根据 Singer 和 Campbell 等 (1955, 1959) 的研究，所产生的复合物中，抗原和抗体的克分子比值 (Ag/Ab) 决不大于 2，这是和沉淀抗体的双价性一致的。根据在不同的 Ag/Ab 比值条件下的超离心实验，还可以测定抗原抗体的亲合力常数。

非常奇怪的是，半饱和硫酸铵对 BSA 和抗 BSA 抗体的结合没有明显的影响，并且游离的 BSA (F) 和与抗体结合的 BSA (B) 的比值 (F/B)，在这样高的离子强度下也没有改变。如果使用标记抗原 BSA-^{131}I，就可以用加硫酸铵达半饱和度前后计数的放射性强度，来测定血流中的游离的和结合的 BSA 的浓度 (Farr 氏法)。这一简便的方法也可以用到某些其他的放射免疫测定系统，如 α-胎儿球蛋白的测定。

抗原抗体沉淀的形成不仅依赖于抗原的多价性和抗体的双价性，而且还依赖于这两种成分的理化性质。例如家兔的抗 BSA 抗体，原为沉淀抗体，经过乙酰化后，虽然仍然能和相应的抗原或半抗原结合，但不能产生沉淀，转变为非沉淀抗体了。豚鼠注射胰岛素以后也能形成非沉淀抗体。利用胰岛素-^{131}I 放射免疫电泳实验可以证明胰岛素-抗体复合物的形成。游离的胰岛素留在原点，结合的胰岛素-抗体复合物和其他球蛋白一同移动。

虽然可溶性抗原抗体复合物的形成机制要比抗原抗体沉淀形成的机制要简单一些，抗体抗原的相互作用仍然可能受到两种大分子之间的非专一的相互作用的干扰。

三、抗体分子和半抗原的结合

当用小分子的半抗原来代替抗原大分子时，抗原抗体大分子之间由于非专一的相互作用力造成的复杂性就可以消除了。因此，关于抗原抗体反应的热力学、动力学以及结合专一性的构造基础等方面的研究，都是在半抗原抗体系统上进行的。

（一）亲合力概念。抗体和半抗原结合能力的测定

抗原抗体反应中，抗原（半抗原）和抗体之间的结合强度称为亲合力（Affinity 或 Avidity）*，可用反应过程中自由能的变化来量度。亲合力的大小依赖于抗体的结合位点和抗原（半抗原）决定簇在空间上的密合程度以及相互作用力的性质。一般说来，抗体抗原结合松散、易于解离者，亲合力低；而结合牢，不易解离者，亲合力高。因之，在实际应用中，亲合力常用下列反应式的平衡常数来表示：

$$\text{半抗原}+\text{抗体结合位点} \rightleftharpoons \text{半抗原抗体复合物}$$

$$\text{或}\quad \mathrm{H}+\mathrm{Ab} \rightleftharpoons \mathrm{HAb}$$

$$\text{平衡常数}\quad K_{\mathrm{H}}=\frac{[\mathrm{HAb}]}{[H][\mathrm{Ab}]},$$

其中平衡常数 K_{H} 称为此反应的结合常数，亦可称为亲合常数。

在结合专一性的构造基础的研究中，通常用某一半抗原的结合常数（K_{H}）与另一参考半抗原的结合常数（K_{rel}）相比较，来表示半抗原构造的变化对结合的影响：

$$\text{相对结合常数}\quad K_{rel}=\frac{K_{\mathrm{H}}}{K_{rel}}$$

一般的抗体制品都是不均一的，存在着多种多样的亲合力不同的结合位点。因此，对于某一半抗原，存在一群结合常数的分布曲线。此情形下，可测定几个不同半抗原浓度的结合情况，并根据假定的分布函数计数出该系统的平均结合常数 K'_{H}（参看 Pressman 和 Grossberg，1968，238 页）。

测定半抗原抗原反应系统的平衡常数，常用下列的几种方法：

1. 平衡透析法

测定平衡常数 K_{H}最常用的方法是平衡透析法（Equilibrium dialysis）。将透析袋内盛以一定量的抗体溶液，放入溶于缓冲液的半抗原溶液中，俟其平衡。当达到平衡时，透析袋内外游离半抗原的浓度 $[H]$ 相等，而袋内半抗原总浓度 $[C]$，大于袋外半抗原浓度 $[H]$，内外半抗原浓度的差 $[C]-[H]$ 就相当于和抗体结合的半抗原浓度 $[\mathrm{Ab}H]$（图11-10）。半抗原浓度可用比色分析或同位素标记法来测定。平衡时，它们之间存在下述关系：

透析袋内半抗原总浓度 $[C]$ − 透析袋外半抗原浓度 $[H]$

= 和抗体结合的半抗原浓度 $[\mathrm{Ab}H]$

或　游离的结合位点浓度 = 抗体结合位点总浓度 − $[\mathrm{Ab}H]$

如抗体为 2 价的，就可以计算出抗体的总浓度 = 1/2 抗体结合位点的总浓度。

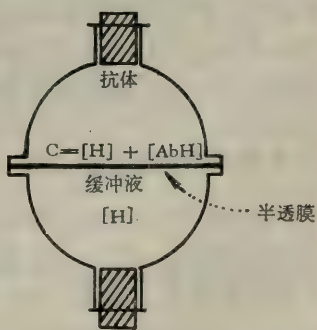


图 11-10　平衡透析装置示意图。

* 在外文文献中，“Avidity”和“Affinity”近来常当作同义词使用，表示抗原抗体反应的结合能。严格说来，“Avidity”是专指抗体的结合位点的性质，而“Affinity”则是指抗原决定簇的性质而言。用结合能表示时，抗体对抗原的“Avidity”与抗原对抗体的“Affinity”在数值上是相等的。为简明起见，本书中文名词只采用“亲合力”一词，其单位为升/克分子。

通常抗体的总浓度是未知的。因此，在不同的半抗原浓度时，分别测［AbH］和［H］，如下例所示，再计算出K_H。

例　设在相同的实验条件下（透析袋内外的体积，抗体总浓度相等），两次实验测得之游离半抗原浓度分别为［H_1］和［H_2］。平衡时，测得透析袋内半抗原总浓度分别为 C_1 和 C_2，则与抗体结合的半抗原浓度分别应为：

$$[\mathrm{Ab}H_1] = C_1 - [H_1]$$

$$[\mathrm{Ab}H_2] = C_2 - [H_2]$$

由于两次实验的抗体总浓度(x)相同，游离抗体浓度［Ab］应分别为：

$$[\mathrm{Ab}_1] = x - [\mathrm{Ab}H_1]$$

$$[\mathrm{Ab}_2] = x - [\mathrm{Ab}H_2]。$$

当达到平衡时，$[\mathrm{Ab}_1] + [H_1] \rightleftharpoons [\mathrm{Ab}H_1]$　①

$$[\mathrm{Ab}_2] + [H_2] \rightleftharpoons [\mathrm{Ab}H_2] \quad ②$$

由此，结合常数

$$K_H = \frac{[\mathrm{Ab}H_1]}{[\mathrm{Ab}_1][H_1]} = \frac{[\mathrm{Ab}H_2]}{[\mathrm{Ab}_2][H_2]} = \frac{[\mathrm{Ab}H_1]}{[x - [\mathrm{Ab}H_1]][H_1]}$$

$$= \frac{[\mathrm{Ab}H_2]}{[x - [\mathrm{Ab}H_2]][H_2]} \quad ③$$

解③式，求出 x 值，再代入③式，即可求出 K_H 值。

2. 萤光灭活法（fluorescence quenching）

抗体蛋白质的色氨酸残基，在紫外光激活下能发射萤光。当抗体分子和半抗原结合时，抗体的萤光就减弱，这一现象称为萤光灭活。萤光灭活程度和抗体结合位点被半抗原结合的比例有关系，因此可以用来测定抗体半抗原平衡中的各数值。当半抗原的吸收光谱和色氨酸残基的萤光发射光谱（330—360 mμ）重合时，萤光灭活效应最显著。因此，黄色的半抗原，如 2,4 二硝基酚（DNP-）最有效。

测量操作法是在一定量的抗体溶液内逐次加入小量的半抗原，每加一次后随即测萤光强度，由此得到一系列的滴定数据。根据这些数据就可求出抗体溶液内结合部位的浓度和 K_H 值。这一方法只需要微量抗体（20—200 微克），操作简便，迅速。但缺点是需用纯化的抗体，并限于黄色半抗原，因而在应用范围上受到限制。

3. 半抗原抑制沉淀反应法

抗体和半抗原结合的结合常数（K_H）最常用沉淀反应抑制实验来测定。在免疫血清或抗体溶液中，先加不同量的半抗原，然后再加入抗原。由于半抗原和抗原竞争抗体分子的结合位点，AgAb 复合物的形成受到半抗原的抑制。抑制程度随半抗原量的增加而增加。当有过量半抗原［H］存在时，它们之间的关系可用下述的化学平衡来表示：

$$\mathrm{AgAb} + H \rightleftharpoons H\mathrm{Ab} + \mathrm{Ag}$$

由此，$[\mathrm{AgAb}] = K\dfrac{[H\mathrm{Ab}][\mathrm{Ag}]}{[H]}$，其中 K = 平衡常数。

从上式可见，当半抗原浓度［H］增加时，［AgAb］的形成就减少。

在半抗原结构和结合专一性的关系的研究中，最常用这一方法来测定半抗原的相对亲合常数（K_{rel}），即比较欲测的半抗原（H）和参考半抗原（H_{ref}），各自在不同浓度时对沉淀反应的影响。实际作近似测量时，只需测定产生50%抑制时所需的半抗原和参考半抗原的浓度，就可求出K_{rel}。由于在此抑制程度时，游离抗体浓度［Ab］是相同的，半抗原抗体复合物浓度［HAb］也是相同的。因此，

$$\text{相对亲合常数}\quad K_{rel}=\frac{K_{H}}{K_{refH}}$$

$$=\frac{[HAb]50\%}{[H]50\%[Ab]50\%}\Big/\frac{[H_{ref}Ab]50\%}{[H_{ref}]50\%[Ab]50\%}$$

$$=\frac{[H_{rel}]50\%}{[H]50\%}$$

在通常实验条件下，抗体的总浓度和半抗原的总浓度相比之下是很小的，因此游离半抗原浓度大略相当于总半抗原浓度。于是上式可进一步简化为：

$$K_{rel}=\frac{[\text{产生50\%抑制所需参考半抗原总浓度}]}{[\text{产生50\%抑制所需加入的半抗原总浓度}]}。$$

半抗原抑制实验所需的抗体量比平衡透析法要少，并且准确性高。因此应用最广。

（二）抗体抗原反应中的能量变化

1. 自由能的相对变化

抗体抗原反应中，抗体与半抗原(抗原)结合的自由能的相对变化可用下述公式来表示：

$$\Delta F_{rel}=-RT\ln Krel.$$

其中，R＝气体常数（2.0卡/克分子/达因），T＝绝对温度

由上式可见，ΔF_{rel}和相对平衡常数K_{rel}，的对数呈直线关系。研究半抗原结构变化对半抗原抗体反应的影响时，自由能的相对变化（ΔF_{rel}.）和相对亲合常数的计量是很有用处的。例如，半抗原的一个氢原子被某一基团取代后，亲合常数增加二倍时，该反应的自由能的变化达到380卡；如果另一结构变化使亲合常数增加四倍时，反应的自由能变化达到760卡。因此，测量亲合常数和自由能的变化就能够把半抗原的结构变化和专一性及亲合力的关系用精确的数量关系表示出来。

2. 热函（Enthalpy）的变化

如果平衡透析是在两种不同的温度下进行的，可得到两个K_{H}数值，由此可以计算出半抗原和抗体结合位点结合时，总能量，即热函的变化。

设两温度分别为T_1，T_2，相应的结合常数为K_1，K_2。按照 Van't Hoff 方程式，热函应为：

$$\Delta H=RT_1T_2\ln(K_2/K_1)/T_2-T_1$$

［例］ 设某一半抗原抗体反应中，已测知

$$T_1=25°C\ (298°K)$$

$T_2 = 35°C$ (308°K)

$K_1 = 2 \times 10^6$

$K_2 = 10^6$

则 $\Delta H = 2.0 \times 298 \times 308 \times 2.3 \times \log(1/2)/10$

$= -1270$ 卡/克分子 或 -1.27 千卡/克分子。

也就是说当 K 增加二倍时，总能量 ΔH 的变化为 -1.27 千卡/克分子。

从热力学定律，已知：$\Delta H = \Delta F + T\Delta S$

其中，ΔS 为熵（Entropy）的变化，单位为 eu（1 e.u = 1 卡/克分子/度）。熵是系统的无秩序性的量度。熵的增加的物理意义是自由度的增加。例如，大分子降解为小分子时，双键加氢成为能沿—C—C—轴自由转动的单键时，都有熵的增加。各种半抗原抗体系统的 ΔH 测定值，表现很大的波动。一些实验里，$\Delta H \fallingdotseq \Delta F$，表明 $\Delta S \to 0$。另一些实验里，ΔH 数值很低，表明 ΔS 可能为正值，即有熵的增加。这种熵的增加可能与半抗原和抗体结合时，抗体表面亲水性基团所束缚的有一定排列秩序的水分子层的破坏有关系。这一问题在讨论抗体抗原反应的分子间力的性质时将作进一步说明。

（三）抗体亲合常数的不均一性

由于抗体分子群的不均一性，用以上几种方法测定的亲合常数（K_H），是不同的抗体分子和某一半抗原结合的许多不同的亲合常数的平均值。

Eisen 和 Siskind（1964）用 DNP-γ-球蛋白免疫家兔后得到的抗体，用 DNP-γ-球蛋白连续沉淀法分离出对 DNP 决定簇亲合力不同的抗体。在三只家兔上，每一只得到九或十部分抗体，并用平衡透析法或萤光灭活法测定每一部分与 DNP 的亲合常数。三只家兔的第一部分抗体的 K_H 分别为：1.6×10^7，1.0×10^9，和 1.4×10^6，个体间有很大的差别。连续沉淀的几部分抗体，亲合力逐次降低。最后的一部分，三只家兔各为：9×10^4，1.1×10^5 和 4×10^4。由于这些差异达到几个数量级，当加入小量半抗原时，半抗原分子主要和亲合力高的抗体结合，只有加入过量的半抗原时，亲合力低的抗体才能和加入的半抗原结合。因此，用平衡透析法得到的平均 K_H 就在颇大程度上失去了意义。

不但在个体之间抗体的亲合常数是高度不均一的，同一个体在免疫过程中抗体的亲合力也有很大的改变。用萤光灭活法证明，对于 DNP 系统在免疫过程中，抗 DNP 抗体对 DNP 半抗原的亲合力有相当大的增加（Fujio 和 Karush，1966）；离体培养的抗体形成细胞的生长过程中，也有类似的表现（Steiner 和 Eisen，1966）。个体之间以及同一个体免疫过程中，抗体的 K_H 不均一性，在选择供放射免疫测定用的抗体时，应特别加以注意。

（四）抗体价的测定

平衡透析法也可用于抗体半抗原系统中，抗体结合的价数，即每一抗体分子结合位点的数目的测定。

Karush (1963) 发现每一抗体分子所结合的半抗原分子的平均数,随半抗原浓度的增加而增加，最后接近一个最大的正整数值 n。 对于单价抗体 $n=1.0$， 双价抗体 $n=2.0$。

设平衡透析法测定的游离半抗原浓度为 c，每一抗体分子上结合的半抗原分子平均数目为 γ，则 γ，c 之间存在下述关系：

$$\gamma/c = nK - \gamma K$$

如以 γ/c 对 γ 作图，理论上应得到一直线。当 $\gamma/c=0$ 时，直线在横坐标上的截距即为 γ 的最大值，即 n。实际上，通常由于抗体分子的不均一性，得出的是一条和直线偏离的曲线。然而，仍可以外推到 γ，由此确定 n 值(图 11-11)。

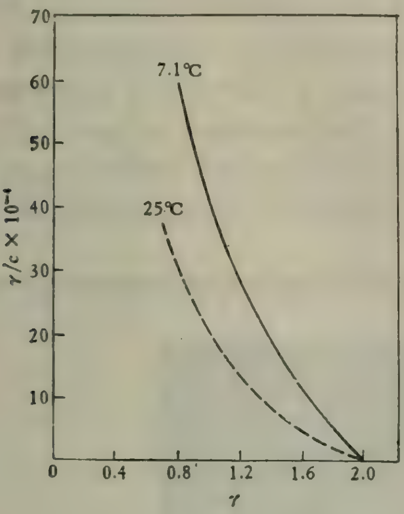


图 11-11 D-Ip 染料 D-phenyl-p- (p-dimethylaminobenzeneazo)benzoylamino acetate，或 $(CH_3)_2N \cdot C_6H_4 \cdot N:N \cdot C_6H_4 \cdot CO \cdot NH \cdot CH(C_6H_5) \cdot COOH$ 与提纯的抗 D-Ip-抗体在 25° 和7.1℃结合的结果。γ 示在游离半抗原浓度 C 时，已与半抗原结合的每一抗体分子结合部位的平均数。(据 Haurowitz, 1968)。

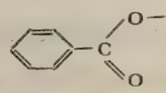
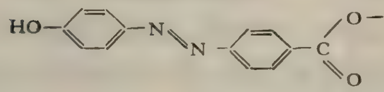
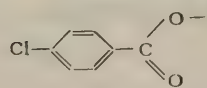
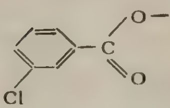
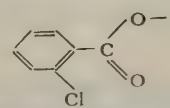
四、抗体半抗原结合的结构基础

(一) 半抗原结构变化对抗体半抗原相互作用的影响

利用前述半抗原抑制抗原抗体沉淀反应的方法，能够系统地研究半抗原结构变化对抗体半抗原结合的影响。 由于这种变化的影响可用 K_{rel} 或 ΔF_{rel} 来量度， 因此可以得到抗体与半抗原结合能力和专一性的构造基础的精确知识。 今举 p-偶氮苯甲酸半抗原系统为例，比较苯甲酸的苯环不同位置被氯原子取代，对抗-p-偶氮苯甲酸抗体专一沉淀的抑制影响。以最适量抗原所产生的沉淀量的％表示抑制程度，并对加入的半抗原克分子浓度作图。 由图 11-12 可见各种苯甲酸衍生物的抑制沉淀反应的能力不等：P-(P'-羟苯基偶氮) 苯甲酸＞p-氯苯甲酸＞m-氯苯甲酸＞苯甲酸(未取代)＞O-氯苯甲酸。计算各种苯甲酸衍生物相对于苯甲酸的 K_{rel}. 值：p-(p'-羟苯基偶氮) 苯甲酸为 23，P-氯苯甲酸为 2.8，m-氯苯甲酸为 1.6，O-氯苯甲酸为 0.17， 相应的 ΔF_{rel}. 见表 11-4。

p-偶氮苯甲酸基团的 Van der Waals 轮廓如图 11-13 所示,并假设抗p-偶氮苯甲酸抗体的结合位点能够和它紧密地结合(图11-4)。至于 p-(p'-羟苯基偶氮)苯甲酸，与苯

表 11-4　苯甲酸的苯环置换后对抗-p-偶氮苯甲酸系统结合的影响。

半　抗　原	K_{rel}	ΔF_{rel} (cal)
苯甲酸 	1.0	0
p-(p′-羟苯基偶氮)苯甲酸 	23	−1700
p-氯苯甲酸 	2.8	−550
m-氯苯甲酸 	1.6	−300
O-氯苯甲酸 	0.17	950

(据 Pressman 等，1954)。

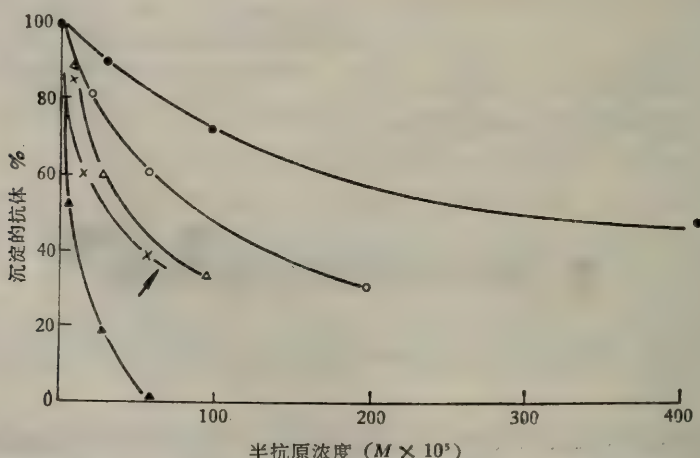


图 11-12　各种半抗原对抗-p-偶氮苯甲酸抗体专一沉淀的抑制。(-●-) 氯苯甲酸；(-O-) 苯甲酸；(-△-)m-氯；(-×-) p-氯；(-▲-)p-羟苯基偶氮(据 Pressman 等,1954)。

甲酸比较，K_{rel}. 为 23($4F_{rel}$. = −1700卡)，和抗体结合甚至比苯甲酸还要强。对这一事实可能的解释是抗体不仅与苯甲酸基团结合，而且与偶氮苯甲酸以及其附着到蛋白质上的部位结合。p-(p′-羟苯基偶氮)苯甲酸除含有 p-偶氮苯甲酸构造外，还含有和酪氨酸相似的苯环，因此与抗体结合部位有最大的接触。

对于其他衍生物，当氯位于间位 (m) 时，结合力也比苯甲酸强 (K_{rel} = 1.8)，但比 p-氯苯甲酸低。这可能是由于抗体结合部位在此区域的密合程度不够高，不致产生干扰；另一可能的解释是氯原子有较大的范德瓦耳吸引力，抵销了干扰的影响。当氯在邻位取代时，结合能降到最低 (K_{rel} = 0.17，ΔF_{rel} = +950 卡)。这是由于空间阻碍的结

果：首先，氯原子的体积较大；其次，苯甲酸的羧基和苯环由于共振而位于同一平面内；邻位被氯原子取代可能使羧基偏离苯环平面。对O-氯苯甲酸之X射线晶体分析发现羧基偏离苯环平面达14°，也证实了这一点。

研究各种和苯甲酸有关的化合物与抗p-偶氮苯甲酸抗体的结合，对抗体结合专一性问题增添了许多知识。例如，用其他基团，如磺酸、砷酸或硝基（大小和羧基相似，但不带电荷）置换羧基的实验表明羧基对于结合是非常重要的：带负电荷而大小不同的基团，或者外形大小相似而不带电荷的基团都不能结合。同样地，用不同大小的原子来取代邻位和间位的氢原子也可以显示抗体在半抗原周围的密合程度。用其他基团来取代偶氮基团，或用环已烷来置换苯环，也可以对结合专一性提供知识。

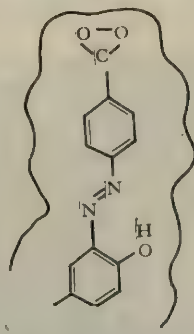


图 11-13　p-偶氮苯甲酸的抗原决定簇的Van der Waals 轮廓（与酪氨酸残基相连）。

L. Pauling, D. Pressman 等从1942年以来，用上述方法，系统地研究了几百个结构上彼此有关系的半抗原对各种抗原抗体沉淀反应的抑制影响。其结果总结在一本专著《抗体专一性的构造基础》（Pressman 和 Grossberg, 1968）中。其主要的结论简述如下：

1）半抗原抑制实验有力地支持，抗体结合位点与抗原决定簇的空间互补性是免疫

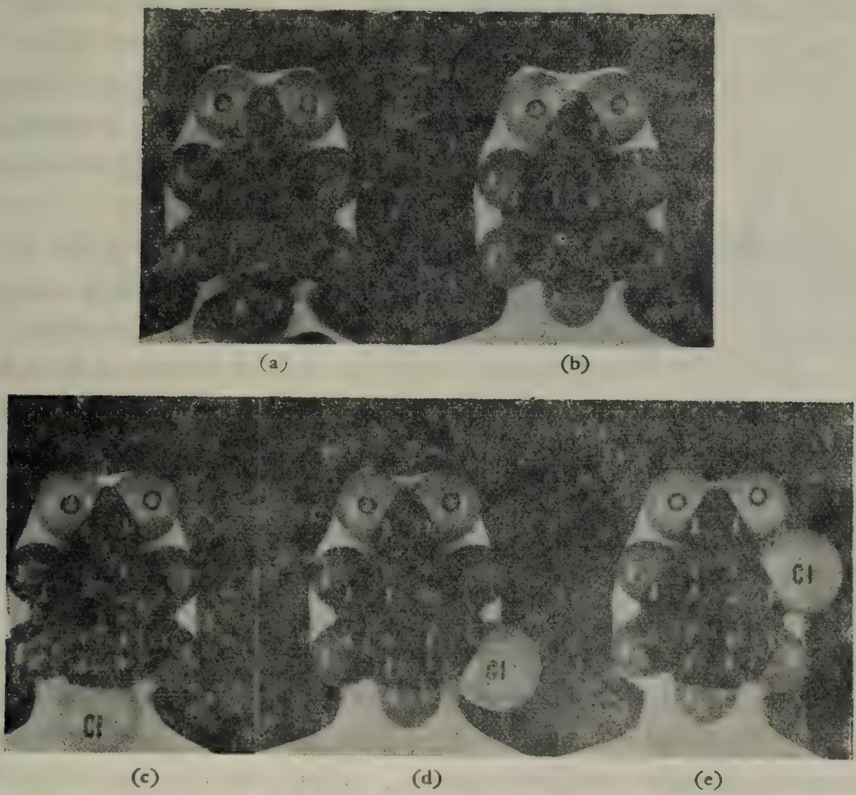
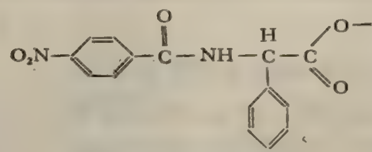
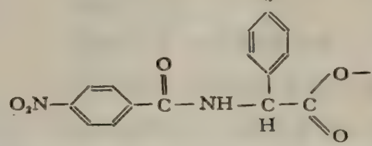


图 11-14　各种半抗原与抗-p-偶氮苯甲酸抗体之结合部位的密合程度的示意图。(a) p-偶氮苯甲酸。(b) 苯甲酸。(c) p-氯苯甲酸。(d) m-氯苯甲酸。(e) o-氯苯甲酸（据 Pressman 和 Grossberg, 1968）。

表11-5 抗 D-和抗 L-苯基 (p-偶氮苯甲酰氨基)醋酸系统中光学异构物和抗体的结合

半　抗　原		Anti-D *K*rel	Anti-L *K*rel
D-phenyl (p-nitrobenzoyl-amino)acetate		1.00	0.0090
L-phenyl-(p-nitrobenzoyl-amino)acetate		0.006	1.00

(据 Pressman 和 Grossberg, 1968)。

学专一性的基础。如上述苯甲酸系统，改变半抗原分子形状(范德瓦耳轮廓)，置换某些基团，或改变其位置，并比较这些构造变化的抑制效应，就可推算出每一个半抗原的相对亲合常数 K_{rel}。 如图 11-14，表 11-4 所示，很高的负 ΔF 值(表示高的亲合力)是和半抗原的范瓦德耳轮廓与抗体的结合位点的高度密合有关系的，而正 ΔF 值(表示亲合力低)，空间的互补性也就低。因此，免疫学专一性依赖于分子轮廓间的相合性。

2) 如果抗原决定簇含有带正电荷或带负电荷基团，其电荷参与抗原和抗体之间的亲合力。例如，带电荷的 p-偶氮苯基—N—三甲基铵离子 ($—N=N—C_6H_4N^+(CH_3)_3$) 和不带电荷的 p-偶氮苯基三甲基甲烷($—N=N—C_6H_4 \cdot C(CH_3)_3$)。这两个分子具有相同的分子形状，三个甲基也有相似的空间排列。 然而，不带电荷的分子的相对亲合常数 K_{rel} 只有带电荷的分子的 K_{rel} 之 1/8。因此，抗体结合位点和半抗原之间可能存在静电吸引力，结合位点之负电荷的羧基可能参与和阳离子半抗原的结合。

3) 立体构型的影响。从光学异构物，顺、反式异构物之间 K_{rel} 的差别，更可看出半抗原与对应的抗体结合位点之间密合程度的重要性。 由于抗体分子是由 l-氨基酸组成的，其结合位点总是光学不对称的。在苯基(p-偶氮苯甲酰氨基)乙酸系统中，发现抗 D-构型半抗原的抗体与 D-构型半抗原的结合比与 L-构型半抗原结合的效率要高 100 倍，反之亦然(表 11-5)。抗 L-构型的抗体对一个大小相差一点的 L-构型的半抗原，仍然比对一个大小相等的 D-构型的半抗原较易结合。

总之，以上这些事实再次证明，抗原抗体分子之间空间结构的互补性是免疫学专一性的基础，并由于相互作用力的性质，要求两反应物的反应表面彼此接近到相距 1 或 2 Å 的距离以内。

(二) 抗体亲合力不均一性的结构基础

抗血清可能包括不同类别的免疫球蛋白 (IgG, IgM, IgA)，它们的结合部位的性质自然会有差别。即使同一类别的免疫球蛋白，并且针对同一半抗原决定簇的抗体，结合位点的性质仍然可能有差别。这可能是由于半抗原决定簇位于载体蛋白质大分子的不同部位；其次，半抗原在载体分子表面可能处于不同的空间位置，即所谓的位置效应(图

11-15)(参看第六章 183 页)。

同一种抗半抗原抗体的亲合常数和结合位点的氨基酸组成都可能不同。因此，能用免疫化学方法把这种不均一的抗半抗原抗体分离为许多具有不同的结合能力的部分，并且能证明这些抗体的不同的结合位点是适合于同一半抗原分子的不同部位。

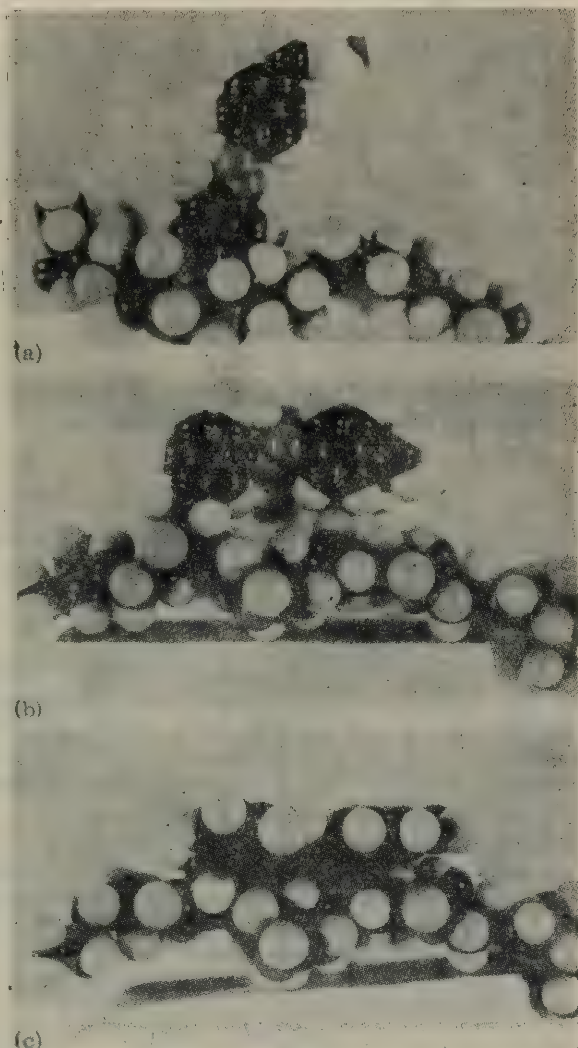


图 11-15 同一个半抗原位于抗原分子表面的不同位置。p-偶氮苯甲酸基团，从载体蛋白表面伸出 (a)，侧卧 (b)，或背卧 (c) 在载体蛋白表面(据 Pressman 和 Grossberg, 1968)。

1. 抗-GIL 系统

GIL 基团是一个异苯二酸基团，其中一个羧基和甘氨酸的氨基，另一个羧基和亮氨酸的氨基相连而成。分子的苯环通过偶氮基与载体蛋白质相连(图 11-16)。

Kreiter 和 Pressman (1964c) 将抗-GIL 血清吸附到一个把 GIL 基团连接到纤维素做成的固相免疫吸附柱上。先将非抗体蛋白质洗脱，然后依次再用 $5\times10^{-3}M$ 浓度的 m-硝基苯甲酰亮氨酸 (L-半抗原)、m-硝基苯甲酰甘氨酸 (G-半抗原) 和异苯二酰-甘氨酸-D,L-亮氨酸 (GIL-半抗原) 分段洗脱。洗脱的各部分相应地称为 L, G, GIL 部分(图 11-17)。用平衡透析法测定各抗体部分之亲合常数，结果见表 11-6。从表 11-6可见，从抗 GIL 抗血清分离出之 G-部分与 G-偶氮半抗原的结合能力大概和全抗血清相近。 G-部分不能和 L-偶氮半抗原结合。 反之，L-部分能与 L-偶氮半抗原结合，而不能和 G-偶氮半抗原结合；并且与 L-偶氮半抗原的结合能力也约和全抗血清相近。 虽然G-和 L-抗体部分各与 G-和 L-半抗原专一地结合，GIL-半抗原分子的其余构造也有影响。 因为，如表 11-6 所示，G-和 L-部分的抗体与 GIL-偶氮半抗原的结合更为加强，$-\Delta F$ 值的变化各从 6.9 千卡→7.3 千卡，6.5 千卡→7.4 千卡。和 G-偶氮半抗原和 L-偶氮半抗原比较，GIL-偶氮半抗原都多一个氨基酸残基。

GIL 半抗原分子的范德瓦耳轮廓，以及各部分抗体的结合位点推想的轮廓如图 11-18 所示：从主要针对 GIL 分子的 G 部分的抗体接受部位 (a,b) 开始，经过同时针对G-和 L-的过渡类型 (c, d)，然后到主要针对 L-的 (e,f)。从表11-6已见到，G-和 L-部分的

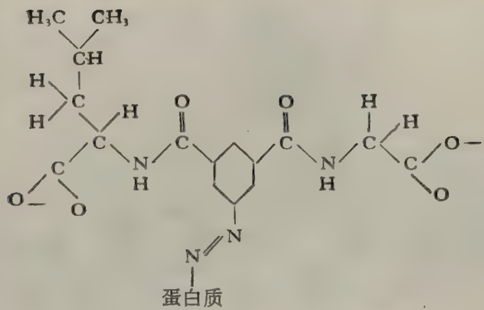


图 11-16 GIL 基团(偶氮异苯二酸酰<甘氨酸 亮氨酸)

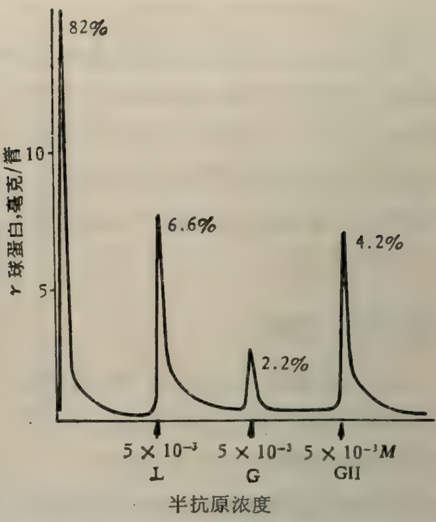


图 11-17 抗 GIL 抗体的分离。用 L, G, 和 GIL 半抗原从 GIL 固相吸附剂上分段洗脱。

表 11-6 抗-GIL、抗-G 和抗-L 抗体部分用 G-, L-和 GIL-偶氮半抗原测定时的性质*

抗体部分		G-偶氮半抗原		L-偶氮半抗原		GIL-偶氮半抗原	
		$K'_H \times 10^{-4}$ (升/克分子)	ΔF_H (卡)	$K'_H \times 10^{-4}$ (升/克分子)	ΔF_H (卡)	$K'_H \times 10^{-4}$ (升/克分子)	ΔF_H (卡)
全 γ-球蛋白	抗 GIL 血清	31	−6950	9.5	−6300	17	−6650
G部分	抗 GIL 血清	27	−6900	∼0		59	−7300
L部分	抗 GIL 血清	∼0		12	−6450	69	−7400
GIL 部分	抗 GIL 血清	6	−6150	6	−6150	106	−7650
抗G血清之G部分		78	−7450	∼0		65	−7350
抗L血清之L部分		∼0		46	−7200	54	−7250

* G-, L-, GIL-各与酚偶连。
(据 Pressiman 和 Grossberg, 1968)。

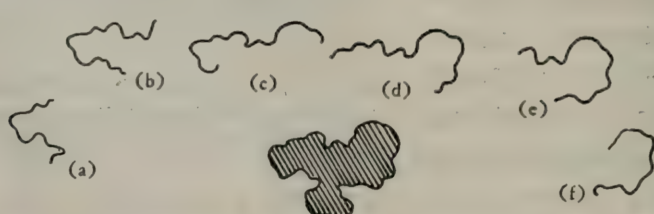


图 11-18 GIL 基团的轮廓以及有关的不同抗体结合部位的轮廓
(据 Kreiter 和 Pressman, 1964)。

抗体与 GIL-偶氮半抗原的结合能量比单独和 G-或 L-偶氮半抗原的结合能各要大400卡和900 卡。从分子构造上来看，这种能量的增加可能是由于和多一个氨基酸残基结合的缘故。这些部分的结合部位所针对的 GIL 半抗原分子的部分由图 11-18 中 b, e 表示。GIL-部分的抗体能与 G-和 L-偶氮半抗原结合，但与 GIL-半抗原的结合能量更高（ΔF 减少 1500 卡）。此外，GIL 部分的抗体比 G-和 L-部分抗体与 GIL-偶氮半抗原结合 更

表 11-7 Anti-Rp 抗体各部分的结合性质

苯砷酸洗脱液浓度	p-(p′-羟苯基偶氮)苯砷酸的结合能力 $K'_H \times 10^{-6}$（升/克分子）	p-碘苯砷酸的结合能力 $K'_H \times 10^{-6}$（升/克分子）
$10^{-5}M$	12.0	1.1
$10^{-4}M$	5.5	—
$10^{-3}M$	2.4	—
$10^{-2}M$	2.2	—
$10^{-1}M$	0.9	0.75
全部 ant-Rp γ球蛋白	4.2	—

（据 Kreiter 和 Pressman，1964b）。

强，相差约 300 卡 从构造上看，GIL-部分抗体似乎可能是针对偶氮半抗原分子的中间部分的抗体 (c, d)。

2. 抗-p-偶氮苯砷酸抗体（Anti-Rp）增加半抗原浓度的分段洗脱分离

抗半抗原抗体被专一的固相免疫吸附柱（含结合的半抗原）吸附后，逐步增加半抗原浓度而被分段洗脱，半抗原浓度低时洗脱量小，浓度增加时洗脱量随之增加。

Anti-Rp 抗体被苯砷酸洗脱之典型的分段洗脱图型见图 11-19。如图所示，每一个抗血清样品各具有可重复的特异的图形，并且为不同的半抗原浓度洗脱的部分具有不同的结合性质。当把分离的每一部分再作一次层析时，各部分仍然是不均一的，并且表现出不同的洗脱图形。 用这样的方法分离的各部分抗体，用平衡透析法测定与 p-(p′-羟苯基偶氮) 苯砷酸的亲合常数各不相同(表 11-7)。 由表可见，随洗脱时所需苯砷酸浓度的增加， 对 p-(P′-羟苯基偶氮) 苯砷酸的亲合常数相应地减小，也就是说，半抗原浓度低时，亲合力高的抗体先被洗脱，半抗原浓度高时，亲合力低的抗体才被洗脱。上述方法对纯化抗半抗原抗体很有用处。

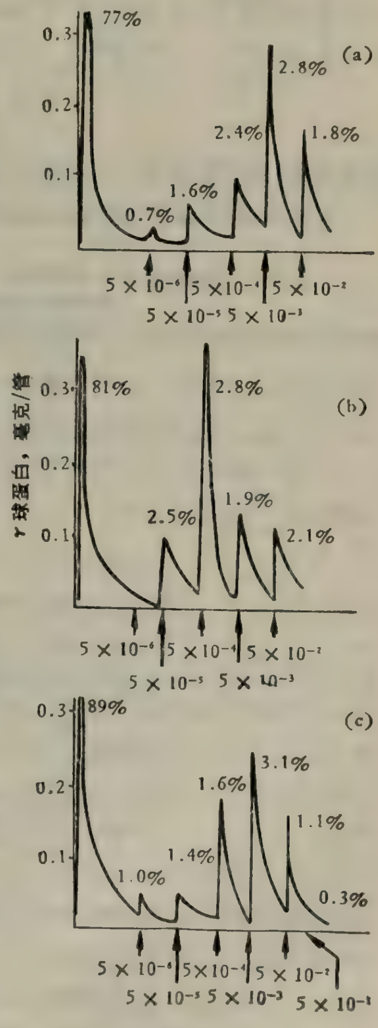


图 11-19 p-硝基苯砷酸将 Anti-Rp γ-球蛋白从 Rp-固相吸附剂洗脱的图形。注意 3 个血清样品的洗脱图形不同（据 Kreiter 和 Pressman，1964)。

五、抗体与半抗原或抗原结合的动力学

由于抗体和半抗原或抗原结合是在溶液系统中发生的，故可作动力学研究。 通过这一类实验发现抗体和相应的半抗原专一地结合进行得非常迅速。 这要比同一半抗原与血清白蛋白非专一的结合要快得多。

［例］ 萘酚-偶氮苯苯基砷酸（Naphthol-azobenzenephenylarsonate） 与抗苯基砷酸决定簇抗体结合的反应速度常数 $K_1 = 2\times10^7$ 升/克分子/秒，而此半抗原与血清白蛋白非专一结合的反应速度常数 $K_1 = 2\times10^5$ 升/克分子/秒。逆反应的速度要慢得多，对于这两个系统，反应速度常数 K_2 分别为 50 和 35 秒$^{-1}$。由于亲合常数 $K_a = K_1/K_2$。对于此半抗原和抗体系统

$$K_a = \frac{K_1}{K_2} = \frac{200\times10^5}{50} = 4\times10^5 \text{ 升/克分子。}$$

同样地，对于半抗原-血清蛋白系统，

$$K_a = \frac{K_1}{K_2} = \frac{21\times10^5}{35} = 6\times10^4 \text{ 升/克分子。}$$

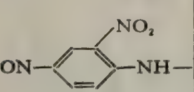
另一半抗原系统 4，5-二羟-3-(p-硝基苯偶氮)-2，7-萘-二磺酸，$K_1 = 1.8\times10^8$ 升·克分子/秒，$K_2 = 7.6\times10^2$ 秒$^{-1}$。

$$K_a = \frac{K_1}{K_2} = 5.8\times10^5 \text{ 升/克分子}$$

DNP 半抗原抗体系统，K_1 也可达 10^8升/克分子/秒。

抗体和半抗原结合的反应速度常数这样高，表明这种结合反应时没有共价键形成，

表 11-8 髓细胞瘤蛋白 MOPC315 与 (1) DNP烷基胺同系衍生物及(2)含叉链、环或芳香侧链的 DNP-衍生物之间相互作用的反应速度和平衡常数

半抗原		$K_{12}^*\times10^{-8}$/克分子/秒	K_{21}^*/秒	$K=(K_{12}^*/K_{21}^*)\times10^{-6}$克分子	$K_{st}\times10^{-6}$ 克分子
1 	$-CH_3$	3.5±0.24	373±30	0.94	
2	$-CH_2-CH_3$	2.8±0.18	143±24	1.95	2.04
3	$-CH_2-CH_2-CH_3$	2.6±0.18	94±11	2.70	
4	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	2.5±0.3	79±10	3.20	3.40
5	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$	1.2±0.12	123±18	1.00	1.10
6	$-CH(CH_3)_2$	3.7±0.22	108±8.6	3.40	
7	$-CH(CH_2CH_2)_2CH_2$	2.55±0.25	116±10	2.20	
8	$-CH_2-CH(CH_3)_2$	2.0±0.14	83±11	2.40	2.70
9	$-C(CH_3)_3$	3.6±0.3	58±6	6.10	
10	$-CH_2-$	1.8±0.15	47±9	3.80	

（据 Pecht，1974）。

因为这些变化都需要较长的时间。

半抗原和抗体的结合是小分子半抗原和抗体大分子的结合位点之间的一个简单的双分子反应，而抗原和抗体大分子之间的反应，则因抗原抗体聚集物之长链和叉链的形成更趋复杂。抗体抗原的总反应在动力学上可分为两个阶段：

1）抗原决定簇和抗体结合位点间的结合，反应非常迅速的阶段；

2）抗原抗体网格生长的缓慢阶段。

通常假定阶段（1）的反应速度与抗体和半抗原的反应速度大约相等。而阶段(2)，网格的生长速度就缓慢得多，在很大程度上依赖于温度、离子强度等条件。用光散射比浊法可以估计抗原抗体相互作用第二时相的反应速度常数。对于 DNP 抗原和抗体系统，反应过程中如果用萤光灭活法和光散射法同时进行测定，结果表明参与抗原抗体聚集物生长的基团与在快速反应阶段与抗体结合的基团是不相同的（Tengendy，1966）。

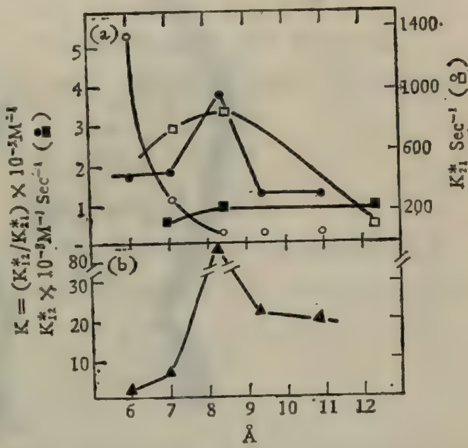


图 11-20 (a) K_{12}（—●— 和 -■-），K_{21}（—○— 和 -□-）与 (b) K(—▲—) 对非极性侧链的羧基或铵基和 DNP 环之间距离的依赖关系（据Pecht,1974)。

在溶液中抗体-抗原（半抗原）复合物存在于动态的结合平衡，可应用快速动力学方法——化学弛豫温度跃迁技术（Chemical relaxation-temperature jump technique）对抗体结合位点的微细结构作动力学定位（Pecht 等，1972； Haselkorn 等,1974）。

半抗原抗体在溶液中的相互作用是一个包括双分子结合和单分子解离的过程：

$$Ab+H \underset{K_{21}}{\overset{K_{12}}{\rightleftharpoons}} AbH$$

其中 K_{12} 为结合速度常数，K_{21}为解离速度常数，其平衡常数$K=\frac{K_{12}}{K_{21}}$。专一的结合速度常数（K_{12}）只在一个有限范围内变动，而专一的解离速度常数（K_{21}），当用半抗原在结合位点内暂留时间（结合位点-半抗原复合物寿命的倒数）表示时，可反映半抗原和结合位点之间的相互作用力和互补性。因此，对于一系列具有不同侧链结构的半抗原，研究其结构特点与抗体结合位点相互作用的结合和解离速度常数的关系时，就有可能区分一个均一的结合位点内的不同的相互作用力，并对其定位。

小鼠髓细胞瘤蛋白 MOPC 315 具有均一的结合位点，能对一系列的二硝基苯(DNP-)衍生物以不同的亲合力结合。用化学弛豫温度跃迁技术测量其反应速度常数和平衡常数，结果列于表 11-8。从表 11-8 可见，K_{21}和 K_{12}随非极性侧链的长度和构造的改变而发生相应的改变，也就是说，结合位点-半抗原复合物寿命的倒数（K_{21}）是非极性侧链长度的函数。当非极性侧链的长度从—CH_3 增加到—CH_2—CH_2—CH_2—CH_3 时，K_{21}从 373 秒$^{-1}$减小到 79 秒$^{-1}$（表 11-8，1-4）。若侧链为叉链或苯环时，这种效应尤其显著，如一个大的疏水性基团位于硝基苯胺的第一胺基 N 邻近时，K_{21}有最小值（表 11-8，10）。此外，侧链的长度和大小超过一定范围时，也会影响 K_{21}值，使其增加（表 11-

8，5-7）。根据这些数据可以推测，此抗体结合位点内的一定位置上存在疏水性亚位点(Hydrophobic subsite)，只有当非极性侧链位置（长度和大小）适当时，才能在空间上配合。因此，系统地改变非极性侧链的长度可以推测出疏水性亚位点的位置在离硝基苯环中心 8 Å 的地方。系统地改变和 DNP 侧链末端相连的羧基（负电性）与硝基苯(DNP) 环中心之间的距离，进一步证明了这一点（图 11-20）。由图 11-20 可见，K_{21} 随羧基和 DNP 环之间的距离发生明显的改变。当羧基和环很靠近时，$K_{21} \doteq 10^3$ 秒$^{-1}$；当距离增加时，便逐渐减小，距离环中心 8.5 Å 时，达到最小值 45 秒$^{-1}$。距离继续增加时，没有明显的进一步变化。另一方面，系统地改变和 DNP 侧链末端相连的铵基（正电荷）与 DNP 环中心之间的距离，测量 K_{21} 值的变化，同样可以确定静电性亚位点 (Electrostatic subsite) 的位置。总结这些实验结果，可得出结论：二硝基苯衍生物和抗体结合位点的结合，除去二硝基苯环的相互作用外，还存在疏水性和静电相互作用。并且根据对这些专一的相互作用力在结合位点上的动力学定位，可以绘制出两个疏水性亚位点 (S_2,S_3) 和一个正电荷亚位点 (S_4) 相对于硝基苯环位点 (S_1) 的位置（图 11-21）。

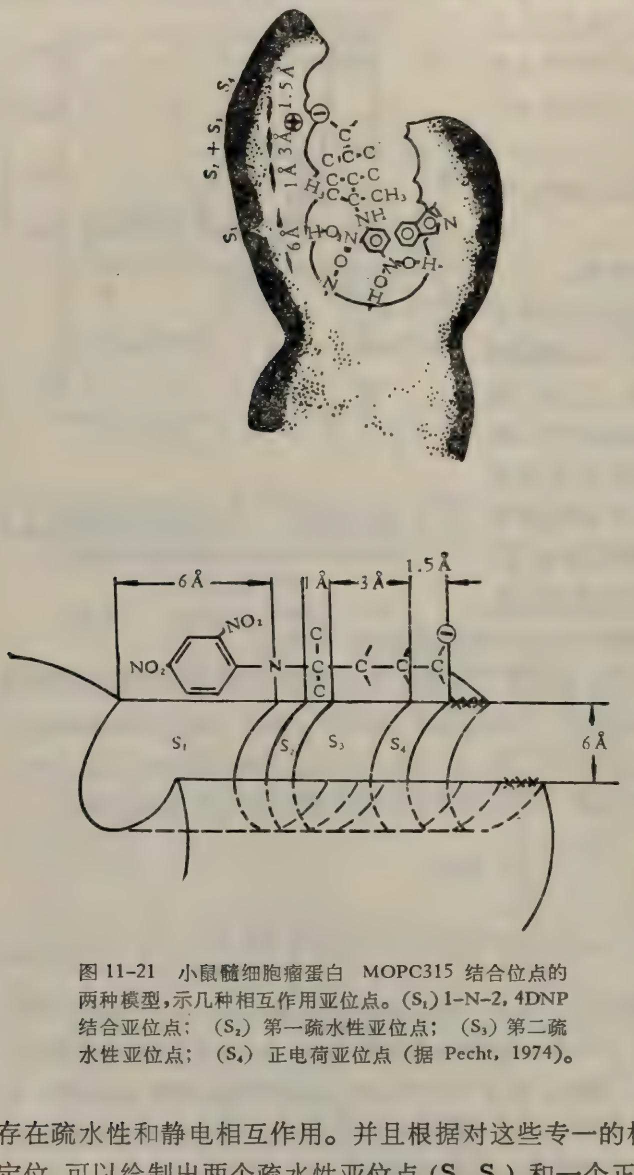


图 11-21　小鼠髓细胞瘤蛋白　MOPC315 结合位点的两种模型，示几种相互作用亚位点。(S_1) 1-N-2, 4DNP 结合亚位点；(S_2) 第一疏水性亚位点；(S_3) 第二疏水性亚位点；(S_4) 正电荷亚位点（据 Pecht, 1974)。

六、抗原抗体反应中的分子间力

抗原抗体反应的动力学研究表明，反应过程中没有共价键形成。半抗原和抗体结合专一性的构造基础的研究还表明，半抗原和抗体结合位点之间必须紧密接触，才能产生足够大小的结合力。这是由于参与抗体抗原相互作用的分子间力都是短程分子力的缘故。这些分子间力有下述几种：

(1) 静电相互作用

抗原的带电荷基团与抗体上互补的带相反电荷基团之间的静电相互作用力。其反应能量与两电荷间的距离平方成反比，并与介质的介电常数成反比。抗体是蛋白质分子，其负电荷基团限于羧基，正电荷基团限于 Lys, Arg, His 或 N末端的氨基；而抗原上的带电荷基团则可能是多种多样的。

(2) 疏水性力 (Hydrophobic forces)

抗原和抗体大分子表面的疏水性基团（如 Leu, Ile, Phe 等的非极性侧链）附近，能形成有秩序地稳定排列的水分子层。当水分子从这些基团表面移走时，排列秩序性破坏，相应地熵增加，而使疏水性基团相互靠拢。

(3) Van der Waals 吸引力

当两个原子距离很近时，每一原子的电子云发生变形而极化，结果一原子的电子和另一原子的正电荷之间相互吸引，产生 London 分散力 (Dispersion force)。各基团间的最大吸引力和它们极化程度的乘积成正比。

(4) 氢键

氢键是一个负电性原子（质子供体）上的氢原子对另一个原子（质子受体）上的一对未配对电子之间的吸引力。如一个氧原子或氮原子上的质子和另一氧原子或氮原子上未配对电子间的相互作用。抗原抗体反应是在水溶液中进行的，它们原来和水分子之间就有氢键存在。这些和水分子间的氢键必须先破坏，才能再形成抗原和抗体之间的氢键。

(5) 偶极子相互作用

由于各种元素的原子具有不同的负电性，由这些元素的原子组成的化合物中，电子在这些原子之间的分布是不平均的，结果形成偶极子(dipole)。一个偶极子可受到按适当方向排列的偶极子的吸引。

(6) 熵的增加

抗原抗体分子间的另一作用力是由于荷电基团在水溶液中，其表面有水分子层结合，并有秩序地排列。当两个电荷相反的基团相互吸引时，这些结合水被排出。由于水分子释放时排列紊乱，结果系统的自由能降低，熵增加，并产生一种力使两种分子结合在一起。

理论上抗原抗体结合专一性与分子间空间相合程度及各种基团分布的关系，可用简图表示(图 11-22) 如下：

1) 抗原决定簇和抗体结合位点在空间上紧密相合。抗原决定簇上的基团分布包括一个负电基团，质子供体，

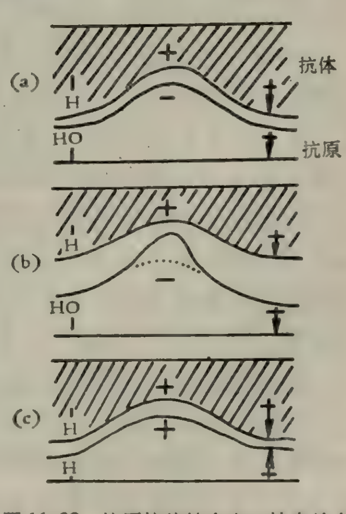


图 11-22 抗原抗体结合专一性有关的空间相合性和基团分析的配合。

一个偶极子和一个非极化区。抗体表面与之紧密相合，具有互补的正电荷，质子受体，偶极子和非极化区。它们在空间上和分子间力的分布和性质上都能很好配合，因此，能够有效的结合；

2）抗原决定簇的形状略有改变，而其上基团的分布没有改变。抗原抗体分子不能紧密接触以形成足够的结合力。因此，不能有效结合；

3）同一抗原和抗体，空间互补相合性很好，但基团改变，彼此不能吸引，甚至相互排斥。因此，仍然不能有效的结合。

因此，从上述可见，抗原和抗体的专一的结合，除了要求在空间上紧密的互补性外，同时还要求两种分子表面基团的分布和性质也必须配合。两者缺一不可。

近年来半抗原-半抗原抗体复合物结构的晶体学分析对半抗原决定簇和抗体结合位点的微细结构，及其相互间的空间关系的阐明，为上述的抗原抗体结合的分子间力的性质的理论推测提供了非常具体而又精确的证据。对于天然球蛋白分子抗原决定簇微细结构的研究表明，抗原决定簇的大小不超过6—7氨基酸残基的范围。构成抗原决定簇的氨基酸的类型主要是极性氨基酸（如 Asp，Glu，His 等）。由此推测抗原决定簇和抗体结合位点之间的相互作用主要是极性性质的。非极性氨基酸则可能通过氢键和疏水性相互作用起稳定作用(参看第一章 33 页，37 页)。

对小鼠 McPC603Fab 和磷酸胆碱复合物的晶体学分析，证明半抗原和抗体结合位点之间的专一结合是通过处于空间互补位置的基团之间形成的氢键和静电键实现的。构成抗体结合位点的重链 Tyr 33(H) 的羟基和空间上邻近的磷酸的氧原子之间，重链的 Arg 52(H) 的胍基和磷酸的另一个氧原子之间形成的氢键，以及 Arg 52(H) 的胍基的正电荷和磷酸的负电荷之间，Lys 54(H) 的氨基和磷酸之间的静电相互作用，均体现了半抗原和抗体之间的结合力。其次，胆碱基团和结合位点 H 链和 L 链在空间上靠近的残基之间（<5 Å），也可能发生静电和 Van der Waals 相互作用(参看第十章图 10-19）(Segal 等，1974)。

对 Fab′ (New)-半抗原复合物的晶体分析，还对半抗原抗体反应亲合力的结构基础提供了直接的证据（Amzel 等，1974）。Fab′ (New) 能和许多半抗原结合，其中对 γ-羟基维生素 K_1 有较高的亲合力（$K_0=1.7\times10^5$ 升/克分子），而对苔红素、尿嘧啶和甲萘醌（Menadione）的亲合力则低很多（$K_0\doteqdot1\times10^3$ 升/克分子）。从 Fab′ (New)-K_1OH 之 3.5 Å 分辨率的立体模型(参看第十章，图 10-14)，可见维生素 K_1OH 分子的醌环部分楔入由 H 和 L 链的高变异区构成的结合位点浅槽(大小为 $16\times7\times6$ Å)的上部，而分子的植酸链则向上延伸与 L 链的 Gly-27 (L)，Asn-30 (L) 贴近，然后折向下方与 L 链的 93 和 94 及 H 链的 104 残基的骨架贴近，其尾端则和 H 链的 54，57 和 67 残基的侧链贴近。甲萘醌半抗原的结构只相当于 K_1OH 分子的醌环部分，并且其亲合力比 K_1OH 低很多。对 Fab (New)-甲萘醌复合物的晶体分析表明，甲萘醌半抗原和 K_1OH 的醌环占据抗体结合位点浅槽上部的同一位置，其他一些亲合力低的半抗原(苔红素和尿嘧啶)也是和同一部位结合。因此，可以把维生素 K_1OH 整个半抗原的亲合力看作是分子的醌环部分和植酸链部分分别和结合位点的相互作用力的总合。甲萘醌和其他亲合力低的半抗原只和抗体结合位点之相当于与醌环相互作用的一部分结合，亲合力自然要低得多。这一实验有力地说明，不同的萘醌化合物(维生素 K_1OH，甲萘醌等)只要分子的 Van

表 11-9 小鼠单株 IgA315 和各种半抗原的反应

半 抗 原	亲合常数(升/克分子)
γ-DNP-氨基丁酸	7×10^7
DNP-β-丙氨酸	4.9×10^7
ε-DNP-L-赖氨酸	2×10^7
ε-DNP-D-赖氨酸	1.7×10^7
δ-DNP-L-鸟氨酸	1.4×10^7
2,4-二硝基苯胺	9×10^5
α-DNP-L-亮氨酸	8.7×10^5
甲萘醌	6.1×10^5
2,4-二硝基萘酚	1.1×10^5
咖啡碱	4.6×10^4
5-醋酸尿嘧啶己酸	3.2×10^4
核黄素	2.8×10^4
2,4-二硝基酚	$\sim4.5\times10^3$

(据 Leslie 和 Cohen, 1973)。

der Waals 轮廓有部分相似的地方，就可能有相似的结合专一性。并且不同的半抗原的 Van der Waals 轮廓和抗体结合位点之空间互补的大小范围不同，密合程度不同，也就决定了它们和抗体之间亲合力的不同。总之，半抗原以及抗原大分子表面的决定簇的空间图式（Topography）及其和抗体结合位点的互补性是结合专一性和亲合力的结构基础。也就是说，体液抗体或免疫活性细胞的表面抗原受体的结合位点所能识别的只是半抗原决定簇大概的 Van der Waals 轮廓。这一概念在理论上有重要的意义，也许可以对抗原结构的无限复杂性和抗体结合位点专一性的有限性之间的矛盾，提供一个合理的解释，因为无限数目的抗原按其有效决定簇的空间图式的相似性也可以归结为有限的种类。实际上，近来对诱导的抗体和单株免疫球蛋白（Monoclonal immunoglobulin）的研究均发现，一个抗体可能和 2 个或许多个结构上很少相关的，甚至无关的半抗原结合，不过其亲合力可能有很大范围的差异(从 $K=10^3$ 到 10^7升/克分子）（表 11-9）(Leslie 和 Cohen，1973)。进一步研究还提示，抗原诱导的抗体也同样可能存在多功能结合位点，即一种抗原(半抗原)诱导的抗体可能和多种半抗原（在结构上和诱导抗原很少相关或无关)结合（Richards 等，1974)。出人意料之外，在一些情形下，一种半抗原诱导的抗体对其他的半抗原反而有更高的亲合力。如小鼠对于硝基羟苯基（NP）产生的抗体对于硝基碘苯基（NIP）的亲合力比对 NP 的亲合力还要高（Imanishi 和 Mäkelä，1973)。这类抗体由于它的这种异常的特性被称为反常抗体（Heteroclitic antibody)。所有这些事实都表明过去关于一个抗体只对一种抗原决定簇或一些和它的结构相近的决定簇结合的传统概念已经和事实不符合了，因而应当改变了。如果承认抗体结合位点有多种结合功能，于是便产生了一个问题，即个别抗体分子的多种专一性和免疫血清的高度专一性的矛盾，又作何解释呢？一个免疫血清的高度专一性应看作整个抗体分子群的统计特性，而不是个别抗体分子结合位点的特性。实际上抗体分子群中的每一分子的结合位点都可能各自具有多种专一性，然而它们彼此之间，一个分子和

另一分子的多种专一性则不必是相同的。对于一个免疫血清来说，只有大多数抗体分子共同具有的专一性才是在宏观上有重要性的专一性，这也就是针对免疫原的专一性。其他的各种专一性虽然存在，但由于一个抗体和另一抗体各不相同，因而被稀释，不能在宏观上表现出作用来了。因此，在一免疫血清的全部抗体分子群中可以期望存在极大量的高度专一的抗体(它们共同的专一性代表抗血清的专一性)，以及极少量的各种不同专一性的抗体——包括被免疫动物从未接触过的抗原的抗体（有大量证据表明确实存在后一类"天然"抗体)。个别抗体分子的多种专一性和整个免疫血清的高度专一性，作为一个抗体分子群的统计现象来看，并不是矛盾的（Richards，1974；Secher，1977；Cameron 和 Erlanger，1977)。这一概念对于抗体专一性及其多样性的起源有重要的理论意义，我们将在以后有关章节再作深入的讨论。

七、颗粒抗原的凝集反应

如第一节所述，Ab/Ag 的重量比值与抗原分子量成反比。如果抗原的大小从分子范围(约 10^2 Å)增加到细胞范围(如细菌直径约 1 微米，细胞为 5—10 微米)，则颗粒的大小增加 100 到 1,000 倍，Ab/Ag的比值就要小 100—1000 倍，于是只需要少数双价抗体就能形成颗粒抗原（细胞）和抗体的凝集物（图11-23)。因此，红血球或其他颗粒抗原的凝集反应是很灵敏的分析方法，可测出<1 微克的抗体。

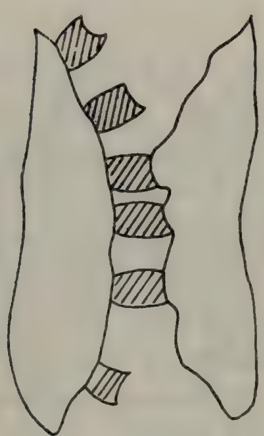


图 11-23 血凝反应血细胞被双价抗体凝集(据Haurowitz，1968)。

每一细胞表面结合的抗体分子的数目不仅依赖于细胞的大小，而且依赖于细胞表面抗原决定簇的数目。当使用铁蛋白标记抗体(抗人血型物质抗体)时，电镜观察可发现一条宽 200—400 Å 的缝把凝集的细胞分隔开来，这条缝的大小是和双价抗体分子的大小相符合的。计算铁蛋白标记抗体分子数目就可以测量出红血球表面抗原决定簇的数目。

应用扫描电子显微镜观察各种血型抗体对红血球的凝集现象，可看到抗 A-抗体(IgM 和 IgG）使 A_1，D 血型阳性的红血球凝集时，血球表面变形，出现许多棘状突起，彼此相连成团(图 11-24b)，而用完全抗 D-血清凝集 A_1，D 血型阳性的红血球时，血球仍然保持原来的形态，从图上可见到许多平滑的双凹圆盘形的红血球，连接簇集成团(图 11-24c)。

凝集过程受 pH、离子强度、温度等因素的影响。这可能是由于细胞表面电荷状态改变的缘故。

Heidelberger 和 Kabat（1937）对细菌(肺炎球菌 I 型）细胞的凝集作用，作定量研究发现抗体 N 和细菌 N 的比值，从抗体过剩时的～3 变动到细菌过剩时的 0.4。这些比值和可溶性抗原沉淀反应中观察到的相近似。这表明被凝集物携带沉降的抗体量远远超过了在细菌表面结合一层抗体分子所预期的量。抗体分子或许可能透入肺炎球菌细胞表面多糖外壳，在其中形成抗原抗体网格。病毒或噬菌体和同型抗体产生的抗原抗体复

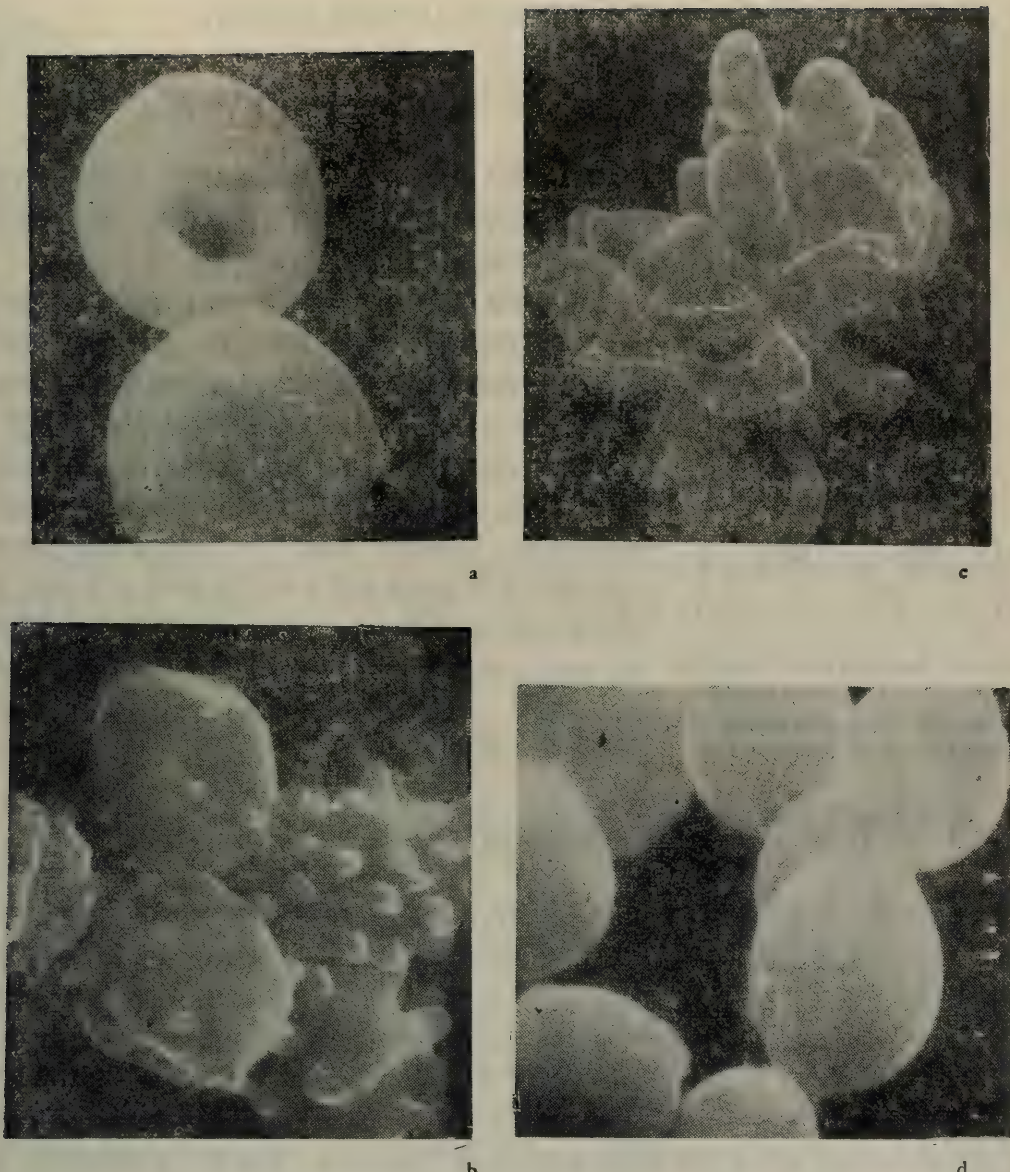


图 11-24 在扫描电子显微镜下观察到的各种血型抗体对 A_1，D 血型阳性红血球的凝集现象。(a) 正常的 A_1，D 血型阳性的红血球，经固定和洗涤(×7,000)。(b) A_1，D 血型阳性红血球，在室温和生理盐水中，被抗-A_1 免疫血清凝集。红血球表面有棘状突起彼此连接。经固定和洗涤(×7,000)。(c) A_1，D 血型阳性红血球，被完全的抗-D 血清凝集。血球保持原来的形态。经固定和洗涤(×2,000)。(d) A_1，D 血型阳性红血球，生理盐水内和不完全抗-D 血清保温 30 分钟，洗涤后，再被抗人 IgG 家兔血清凝集。经固定和洗涤(×7,000)(据 Van Oss 和 Mohn, 1970)。

合物，由于它们的大小超出了光学显微镜分辨率的范围，通常也被看作是“沉淀”，而不是凝集物。流感病毒和同位素标记的同型家兔抗体产生的沉淀中，每一个病毒分子平均能结合 $2—3\times10^3$ 抗体分子。

有人测定在有专一的血球凝集素存在时红血球悬液和血球凝集素之间的平衡，并将测得的平衡常数 K 换算为在不同温度的结合自由能，由此得出 $\Delta H=-6.5$ 千卡/克分

子，$\Delta S = +8$ 卡/克分子·度。这些数值和沉淀反应的数值是相近的。

（一）被动血凝反应（Passive haemagglutination）

将可溶性抗原用化学方法连接到红血球表面，然后加微量的相应的抗血清就可引起红血球凝集作用(图 11-25)。这种方法称为被动血凝反应，可用于测定微量可溶性抗原的抗体。

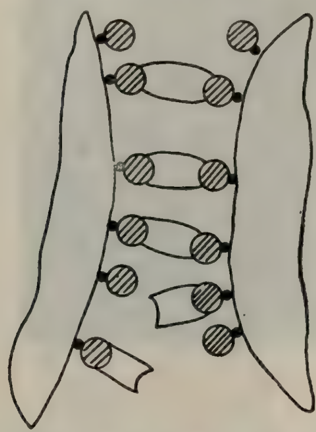


图 11-25 被动血凝反应。BSA 分子(◍)被联苯胺(●)连接到红血球表面。两个镀 BSA 的红血球被双价抗 BSA 抗体凝集在一起(据 Haurowitz)。

通常用鞣酸处理红血球，再"镀"上可溶性蛋白质抗原。也可以用甲醛或戊醛处理红血球，这样的红血球比较稳定,可以保存几天,再用鞣酸处理并镀上抗原。其他常用的连接蛋白质和红血球表面的连接剂有联苯胺等。

被动血凝反应中，红血球表面固着的抗原分子数量很大。例如,用双重氮化联苯胺作连接剂时,每一个细胞表面可连结上 1.3×10^6 BSA 分子，相应地凝集这样的"镀"BSA 的红血球需要约 5×10^5 抗 BSA 抗体分子。被动血凝反应是测定双价沉淀抗体的很灵敏的方法。但是，应注意防止一些非专一因素（如正常 γ 球蛋白聚集物)的干扰。有人改用乳胶（latex)、皂土颗粒代替红血球吸附抗原,效果也很好。

（二）不完全抗体和间接被动血凝反应（Coomb's test）

如前所述，只有双价抗体才能产生不溶的沉淀，而单价抗体则不能。同理，血凝反应也是如此。人类抗 Rh 因子抗体，不能使同型红血球凝集，但能和这些血球结合并阻止其他种类的凝集素使这些红血球凝集。这类抗体称为不完全抗体（Incomplete antibody)。不完全抗体的这种特性可能是由于其分子的理化特性妨碍了同时和两个抗原决定簇结合。如果用不完全抗体致敏红血球，然后再用抗人 γ 球蛋白家兔抗体来处理时，这些细胞就会发生凝集作用(图 11-26)。这种方法称为 Coomb 氏法，非常灵敏，能测定出直接被动血凝反应所不能测出的微量抗原或不完全抗体。扫描电子显微镜观察，发现经 Coomb 氏法，即A_1, D 阳性红血球先经不完全抗 D-血清致敏，再用抗人 γ 球蛋白抗体处理凝集的红血球呈柠檬形，表面被一层薄膜被盖，在几处还可以看见细胞通过表面上的细丝连接在一起(图 11-24d)。

Grubb (1956) 利用经改进的 Coomb 氏法，发现了人类免疫球蛋白抗原性的同种异型现象(参看第三章)。所用方法的原理如下：Rh^+人红血球先经具有已知的同种异型性状，如 Gm(a+)的人抗 Rh 抗体(不完全抗体)处理。然后加人具有同一遗传标记的类风湿性关节炎因子(人类抗 γ 球蛋白抗体)，这些处理过的红血球就会发生凝集现象。如果在此测定系统中，加入过量的具有同一 Gm 决定簇的免疫球蛋白时，这些决定簇就将竞争类风湿性关节炎因子，因而抑制凝集现象，这为正反应。如果加入的免疫球蛋白的抗原决定簇属于不同的遗传类型,就不能抑制凝集现象，这为负反应(图 11-27)。

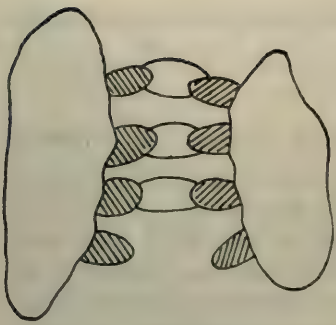


图 11-26 Coomb 氏法测定不完全抗体。红血球镀上人单价抗体(斜线),再加家兔抗人 γ 球蛋白抗体,产生凝集反应(据 Haurowitz, 1968)。

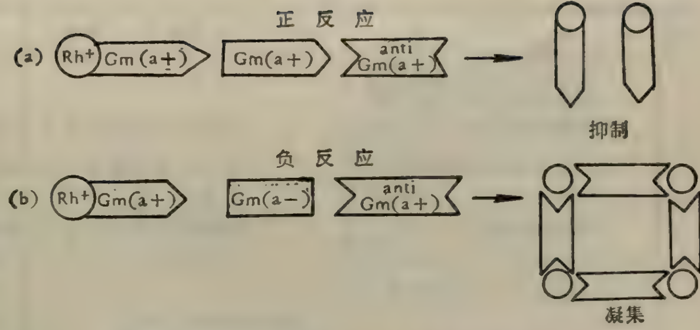


图 11-27 人类免疫球蛋白之同种异型的测定法。

人类抗人类 γ 球蛋白目前是一个在免疫遗传学和医学上广泛应用的分析工具。例如,在区别免疫球蛋白遗传标记的 Gm 系统,以及个体型现象 (Idiotypia),新生儿溶血症的诊断等方面都是非常有用处的。

八、抗体的测定

根据上述抗体和抗原相互作用原理,建立了许多种抗体定量或定性的测定方法,其中一些方法达到很高的灵敏度。抗体的各种测定方法及其灵敏度见表 11-10。

上述这些方法中,有许多种方法所测得的结果不只是依赖于抗体的量,而且还依赖抗体的性质(类别、价数、亲合力等),以及有无补体存在等条件。整体内的测定还要受到寄主内环境因素的影响。换句话说,实际上它们只是抗体功能的量度,而不是抗体总量的量度。因此,用不同的方法得到的结果,往往难于互相比较,甚至互相矛盾。为了解释这些复杂的结果,以及选择能更好地反映抗体总量或适合特定实验目的的方法,就有必要把这些方法按其抗体抗原相互作用的方式,区分为三大类,即初级、二级和三级反应。抗体和抗原分子的初级反应(抗原决定簇和抗体结合位点的结合)是一切免疫反应最初的和基本的过程,可以用和抗体结合位点结合的抗原量来量度。因此,根据初级反应的测定方法能够比较直接地反映抗体的量。通常条件下,这种初级反应需要通过与补体系统以及反应环境间一系列相互作用的放大,才能成为肉眼可观测到的现象,呈现为沉淀、凝集、固定补体(溶血)以及中和反应等次级反应。三级反应又是次级反应在整体内通过组织细胞间的相互作用而表现出来的更为复杂的现象。因此,根据后两类反应建立的测定方法所测定的是一定种类抗体的功能表现,只是在不同程度上间接地反映了抗体的存在和含量。

如前所述,抗体和抗原的结合(初级反应)可用下式表示:

$$Ag + Ab \underset{Kd}{\overset{Ka}{\rightleftharpoons}} Ag \cdot Ab$$

表 11-10 抗体测定的各种方法及灵敏度

测定类别	方法	抗体最小检测量	文献
一级	利用沉淀抗原抗体复合物分离结合抗原和游离抗原		
	50%硫酸铵沉淀（Farr 氏法）	0.05—0.1 微克/毫升	Farr, R. S. (1958), *J. Inf. Dis.* **103**,239.
	抗免疫球蛋白(双抗体法)	微克一毫微克/毫升范围	McDevitt, H. O. 等(1965), *J. Exp.med.* **122**, 517.
	放射免疫测定法	毫微克一微微克/毫升范围	Yalow, R. S. 和 Berson, S. A. in "Methods of Biochem. Analysis" V. 12, p. 69; "*Methods in investigative diagnostic endocrinology*" 2A, part I. p. 84.
	专一免疫吸附剂		
	比色法	0.5—10微克/毫升	Gill & Bernard (1969) *Immunochem.* 6, 567.
	同位素标记抗体	0.001—0.01微克/毫升	Mann, L. 等 (1969) *J. Imm,* **102**, 618.
	放射免疫电泳(加抗免疫球蛋白)	0.02微克/毫升	Stechschulte & Aurten (1970) *J. Imm,* **104**, 1052.
	Coos 氏免疫萤光法(定位)	一个产生抗体的细胞	Coons, A. H. "*general cytochem. methods*" Vol. I, p. 339.
二级	沉淀反应		
	微量克氏定氮法	120微克/毫升	Kabat, E. A.(1961) *Exp. Immunochem.*, 2nd. Ed. Marrack, J. R. (1963) *Brit. Med. Bull.* **19**, 178. Ackroyd, J. F. (1964) *Imm. Methods*
	比色法		
	Lowry 法	10 微克/毫升	
	微量 Lowry 法	0.5微克/毫升	
	环状测定	20—30微克/毫升	
	p-80 结合法	<1微克/毫升	Talmage, D. W. & Maurer, P. H. (1953) *J. Inf. Dis.* **92**,288.
	琼脂扩散		
	单向单扩散法（Oudin 法）	12—110 微克/毫升	Kabat, E. A. (1961) *Exp. Immunochem*, 2nd. Ed. Williams, C. A. & Chase, N. W. (1968) *Meth, in Imm. & Immunochem.* V. I, II.
	单向双扩散法（Preer 法）	20—50 微克/毫升	
	双向双扩散法（Ouchterlony 法）	>40 微克/毫升	Ouchterlony, O. (1958) "Progr. Allergy" V. 5, p.1.
	圆径扩散（Mancini 法）	10 微克/毫升	Mancini, G. 等 (1967) *Immunochem.* **2**, 235.
	免疫电泳		
	Grabar 微量法	100微克/毫升	Stechschulte, D. J. & Austen, K.F. (1970) *J. Imm.* **104**, 1052.
	对流免疫电泳法（Laurell 法）	>100 微克/毫升	Laurell. C. B. (1965) *Anal. Biochem.* **10**, 358.

续 表

测定类别	方法	抗体最小检测量	文献
二级	凝集反应		
	细菌		
	伤寒菌	0.12 微克/毫升	Kabat, E. A.(1961) *Expt. Immunochem.*, 2nd. Ed. Stavitsky, A. B. (1954) *J. Imm.* **72**, 360. Campbell, D. H. & Garvey等 (1963) *Methods in Immunology*
	肺炎球菌	60—120 微克/毫升	
	红血球同族凝集素	0.6—1.2 微克/毫升	
	Rh 阳性红血球-抗免疫球蛋白法 (Coomb 氏法)	0.03 微克/毫升	
	被动血凝法	0.03 微克/毫升	
	补体固定		
	微量法(家兔抗体)	0.1—1 微克/毫升	Wasserman, E. & Lerine, L. (1961) *J. Imm.* **87**, 290.
	中和反应		
	噬菌体半抗原复合物中和反应	0.0006 微克/毫升	Taussig, M. J. (1970) *Imm.* 18:323 Haimorich, J. 等 (1970) *B. B. A.* **207**, 125. Ckbopyob, B. J. (1972) *Immunochem.* **9**, 366.
三级	过敏反应		
	局部被动皮肤过敏反应(豚鼠皮肤)	0.02 微克/毫升	Ovary, E. (1958) *Progr. in Allergy* V. 5, p. 459.
	Schultz-Dale 反应	6 微克/毫升	Campbell, 等 (1963) *Methods in Immunology*,
	Prausnitz-Küstner 反应(人皮肤)	0.06 微克/毫升	Marrack, J. R. (1963) *Brit.Med. Bull.* **19**, 178.
	Arthus 反应	60 微克/毫升	
	毒素中和(家兔皮肤)	2 微克/毫升	

(据 Gill, 1970, Nezlin, 1972)。

血清样品中抗体总浓度是游离的和结合的抗体结合位点的和，而游离抗体结合位点浓度([Ab])，按照质量作用定律遵守下式：

$$\frac{[Ag][Ab]}{[Ag\cdot Ab]}=K_d\text{(解离常数)},$$

按照 Kd 值的大小，抗体可分为非亲合抗体群 (Nonavid antibody population) 和亲合抗体群 (Avid antibody population)，前者 Kd值相当高，后者 Kd值相当低。从实际应用上看，亲合抗体群和抗原的结合程度对抗原浓度变化的反应比非亲合抗体群更敏感。大部分含亲合抗体群的抗血清，在抗原过剩区内，和抗体结合的抗原量能近似地反映该抗血清结合抗原的总能力。因此，加入的抗原浓度的变化，就会使结合抗原和游离抗原的比值 (B/F) 起显著变化。反之，大部分含非亲合抗体的抗血清中，抗原浓度的变化虽能引起结合抗原的量显著增加或减少，而结合比值 (B/F) 的变化却不大。此外，

表11-11 根据抗原抗体初级相互作用的测定方法

定量测定

A. 利用沉淀抗原抗体复合物分离游离抗原和结合抗原
   1. 50% 硫酸铵 (Farr 氏法)
   2. 抗免疫球蛋白(双抗体法)

B. 萤光分析
   1. 萤光灭活
   2. 萤光加强
   3. 萤光偏振

C. 抗原的表面物理吸附
   1. 纸层析
   2. 硅,爽身粉,漂白土
   3. 葡聚糖包裹的活性炭

D. 专一免疫吸附剂

定性测定

A. 利用抗原和不溶性抗原抗体复合物结合
   1. 间接放射免疫电泳
   2. 免疫扩散
   3. 直接免疫扩散和免疫电泳
   4. 免疫萤光法

B. 利用结合和游离抗原电泳速度的差异
   1. 放射凝胶电泳
   2. 自由电泳

表 11-12 根据抗原抗体次级相互作用的测定

A. 沉淀反应
   溶液内
   凝胶内

B. 凝集反应
   直接
   被动

C. 补体固定

D. 溶血反应

表 11-13 根据抗原抗体三级相互作用的测定

A. P-K 测定(反应素)

B. 被动皮肤过敏反应 (PCA)

C. Arthus 反应

D. 毒素中和反应

还应注意到无论亲合或非亲合抗体群,在上述条件下,对抗体浓度变化都很敏感。由于这一原因,当欲测定一抗血清之总抗原结合能力时,最好增加抗原和抗体的浓度,并在抗原极度过剩时进行测定。根据初级反应的定量和定性的方法见表 11-11。

次级相互作用是一系列初级反应在一定条件下的表现。常用的次级反应测定法如表 11-12 所示。区分初级和次级测定的必要性,可以从以下事实看出来。就沉淀反应而论,一些抗体群能和抗原产生沉淀,而另一些抗体(如反应素)则不能。因此,沉淀反应只能表示抗血清的沉淀能力,而不能测量抗体总量。同样地,补体固定法是表示某些种类的抗体(主要是 IgG 和 IgM) 利用补体成分的能力,而另一些种类的抗体(如 IgE,IgA)则不能固定补体。溶血反应同样也依赖补体,并且 IgM 比 IgG 的溶血能力要强许多倍(参看第八章)。凝集反应是测定抗血清凝集带有或"镀"有抗原的颗粒的能力。已知 IgM 比 IgG 的凝集能力要高 50 到 500 倍。总之,次级反应测定法只能反映抗血清中某些抗体某方面的功能,而不能测量抗体总量。由于这种原因,对于非均一的或未知的抗体系统,用某一种次级测定法时得到负结果,改用另一种方法时又可能得到正结果,各种方法之间往往缺乏可比性。虽然如此,次级测定法(特别是凝集反应和补体结合反应等)实际应用仍然很广泛。不过对所得结果作解释时,应当充分考虑到这类方法上述的限制性。

三级反应是初级反应在整体内的表现(表 11-13)。除去受影响初级和次级反应的因素控制外,还要受整体内的因素,包括组织细胞的抗体受体和化学受体、寄主补体水平、白血球和肥大细胞数目以及神经体液调节因素等的影响。因此,又要比次级反应复杂得多。同样应当着重指出,三级反应只是某类抗体某方面的功能表现,而不代表抗体总量。用某一种三级测定法得到负结果,并不能说明就没有抗体存在。此外还应指出,由抗原

抗体相互作用产生的免疫防御和免疫损伤机制，实际上都是整体内三级反应的表现（通常还需要补体系统的参加）。

（一）初级相互作用定量测定法

抗体抗原的结合是一系列免疫反应的起点，依条件而定，它们可能导致或不导致次级和三级反应的发生。初级相互作用测定法直接反映一定抗体能结合多少抗原量的能力，而无需依赖那些影响次级和三级反应的因素。因此，当其他两类测定呈阴性时，初级测定仍可能呈阳性。一般说来，初级相互作用定量测定需要满足下述三个共同的条件：

1）每一测定系统需要一个纯化的抗原或抗体；

2）需要把可溶性抗原抗体复合物与游离的抗原或抗体分离；

3）需用高度灵敏的方法测定抗原或抗体，通常是借助放射性同位素或萤光标记抗原或抗体。由于放射性同位素标记物的放射强度可以极为灵敏的测定，因而大大提高了测定的灵敏度，达到超微量（ng—pg 范围）水平。

根据初级相互作用中未标记抗原对标记抗原和专一抗体结合的竞争性抑制原理而发展起来的放射免疫测定（Radioimmunoassay），是目前体液内微量抗原（半抗原）超微量测定的最好方法，将留待附录里专门讨论。这里先叙述几种根据不同的抗原抗体复合物分离法而建立起来的抗体定量测定的简单原理：

1. 使抗原抗体复合物沉淀从而分离结合抗原和游离抗原

（1）*硫酸铵法*（Farr 氏法）

这是一种适合于一些非透析抗原的初级测定法。它测量抗血清结合可溶性大分子抗原的能力，对沉淀抗体和非沉淀抗体都适用。最初用于 BSA-抗 BSA 系统。其原理是 ^{131}I-BSA（标记抗原）溶解于 50% 饱和硫酸铵（SAS/2），而可溶性 ^{131}I-BSA-抗体复合物在同一条件下则不溶解。

将一定量的 ^{131}I-BSA 标记抗原加入到一系列逐次稀释的抗-BSA 血清中，在抗原过剩点，可溶性免疫复合物（^{131}I-BSA-抗体）在溶液中达到平衡，但不能自动形成集聚物沉淀。此时若加硫酸铵至 50% 饱和度（SAS/2）后，原来可溶的免疫复合物便被沉淀。SAS/2 能显著地抑制此免疫复合物的形成和解离，因而不会改变加硫酸铵以前存在的，与抗体结合的和游离的 ^{131}I-BSA 的比值（即 B/F 值）。

实际操作是把定量的标记抗原加到经一系列稀释的抗血清中，加 SAS/2 后，测量沉淀抗原的百分比，并求出能沉淀 33% 加入的抗原之抗血清稀释度，称为“ABC-33”终点。SAS/2 沉淀的放射性强度表示抗血清中的抗体和抗原结合能力，并非自动沉淀的抗原或抗体的量。测定结果可用每毫升未稀释血清中所含抗体能结合的 ^{131}I-BSA 的含氮量（μg N）表示。ABC-33 终点是任意选定的，因为在这种抗原过剩程度时，不发生自动沉淀，同时 SAS/2 沉淀中所含标记抗原的放射强度又可供精确测量（Farr，1958）。

这一方法在许多免疫学问题的研究中，得到广泛应用，如用于比较人和家兔抗血清之抗原结合能力和沉淀能力，区别微量的同种的和异种的交叉反应的抗原决定簇，抗原抗体相互作用中结合和解离速度、以及非沉淀抗体的测定等。除最先用于 BSA-抗 BSA 系

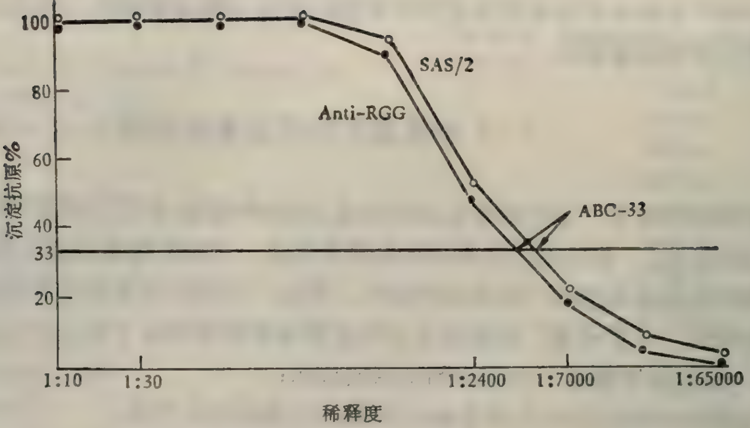


图 11-28 家兔抗血清加 SAS 或抗家兔丙种球蛋白(Anti-RGG)后 ^{131}I BSA 抗原沉淀百分比。用这两种方法时，ABC-33 终点，或加入抗原达 33% 沉淀时抗血清的稀释度，均约为 1∶5000(据 Minden 等,1969)。

统外，还可应用于其他抗原抗体系统，如卵白蛋白，α-乳白蛋白，链球菌 M 蛋白质，豕草花粉抗原，细菌内毒素，人 IgG 的片段 Fab 和 Fc，以及甲胎蛋白的测定。本方法自然限于 SAS /2 不沉淀的大分子抗原。

(2) 抗免疫球蛋白沉淀抗原抗体复合物(双抗体法)

用异种的抗 IgG（二级抗体，如用兔抗体作一级抗体时，常用羊抗兔 IgG 作二级抗体）代替硫酸铵，共同沉淀可溶性^{131}I-抗原抗体复合物（Skom 和 Talmage，1958；Schalach 和 Parker，1964）。对于家兔抗 BSA-BSA 系统，硫酸铵法和双抗体法的灵敏度是相近的(图 11-28)。两种方法中，产生 33% 抗原沉淀时所需的抗血清稀释度(即 ABC-33 终点)均为 1 /5000。

双抗体法的局限性首先在于需要相当大量浓的二级抗体来沉淀抗原抗体复合物。其次，抗 IgG 和标记测试抗原之间，若存在交叉反应就不能应用。此方法已成功地应用于下列抗原的抗体测定，如胰岛素，BSA，马血清白蛋白，人生长素等，以及 HCG 抗原的测定。

2. 表面物理吸附

某些抗原或半抗原易被惰性表面(如滤纸、玻璃，硅酸盐颗粒等)非专一的吸附，而它们的可溶性抗原抗体复合物则不被吸附。利用这种性质，就可把标记的结合抗原 (B) 和游离抗原 (F) 分离。这一原理曾被首先应用于激素的放射免疫测定。

(1) 滤纸层析法

Berson 等 (1956) 最先利用游离的胰岛素易于被滤纸吸附的原理于血液中胰岛素的放射免疫测定。将标记抗原 (^{131}I-胰岛素) 和抗血清保温后，把此混合物点在滤纸上作电泳，游离的^{131}I-胰岛素 (F) 被滤纸吸附留在原点，而结合的^{131}I-胰岛素 (B) 和抗体一起向阴极移动。计数滤纸不同部位的放射强度，求出 B /F 值。利用和未标记抗原的竞争

结合法，从标准曲线就可求出未知样品中胰岛素浓度。这一方法已经应用到其他多肽和蛋白激素，如胰升血糖素、生长素和副甲状腺素等的测定中。

这一方法的优点是取样时吸量误差不影响测定结果，因为所求的只是 B/F 比值。其限制是每一滤纸条上试样须小于 300—400 微升。各种牌号的滤纸，对血清中的胰岛素或其他蛋白激素之吸附能力不同，差异相当大。长时间电泳还可能导致抗原抗体复合物的解离。这些都是缺点。

(2) 硅酸盐颗粒吸附

利用各种硅酸盐颗粒的表面，如爽身粉（水合硅酸镁），硅微粒，漂白土（Fullers' earth，复杂的硅酸盐）等，能吸附标记的游离抗原（F），而和抗体结合的抗原（B）则不被吸附的特性，也可以测定某些多肽激素。

实际操作时，把硅酸盐微粒直接加入到含一定量的标记激素，专一抗体和未知血清样品的试管中。经激烈振荡后，离心，倒去上清液。计数每管沉淀物的放射强度，代表未结合标记抗原量。从已知加入标记抗原的总量，就可求出 B/F 值。再从标准曲线就可算出未知血清样品中激素的量。

此方法可以分析较大量溶液。当血浆中内源激素的浓度很低，如 ATCH，或不易制备高比强的标记抗原时，这一方法是有实用价值的。应用此法测定过的抗原有人的生长素，副甲状腺素，胰岛素，ACTH 等（Rosselin 等，1966）。

(3) 镀葡聚糖的活性碳

镀葡聚糖(分子量＝80,000) 的活性碳颗粒能吸附分子量不大的抗原，如胰岛素，而不能吸附其免疫复合物。因此可用于胰岛素 B/F 值测定。此法的优点是简便、迅速。所得结果和其他放射免疫测定也不相上下（Herbert 等，1965；Meyer 等，1967)。

(4) 专一抗体吸附到高聚物表面(固相法)

一些塑料，如聚丙二醇和聚苯乙烯的表面能吸附专一抗体，这种吸附了专一抗体的固相表面又可以吸附放射性标记抗原。实际操作是用大小适合于闪烁计数器内测量的塑料管，内表面涂上一层专一抗体。这种涂上抗体的管壁就可用来和标记抗原结合，并作为和非标记抗原竞争结合的地点。经一定时间保温免疫反应完成后，洗去游离的标记抗原。计数管壁的放射强度，代表与抗体结合的标记抗原量（B），由此求出 B/F 值。此方法的优点是简便，迅速，所有操作步骤，从保温、结合和游离抗原的分离到测量，都在同一塑料管中完成（Catt 和 Tregear，1967)。

3. 专一免疫吸附剂 (Immunoadsorbents)

将抗原结合到固相载体上制成的免疫吸附剂，除去对抗体纯化有很大用处外，也可用于抗体或抗原的微量测定。

(1) 抗体的测定

先将纯化的抗原和固相载体结合，制备成专一的免疫吸附剂。对一定量的免疫吸附

表 11-14 抗白蛋白抗体的定量测定(免疫吸附剂法)

免疫吸附剂量	加 入 量 (毫升)			分离的蛋白质(微克)	非专一吸附(微克)	抗体含量(微克)
	0.85% NaCl	正常家兔血清	免疫血清			
	对照——非专一血清 (1N NaOH 洗脱)					
结合白蛋白量 6.6 毫克	1	—	—	104	—	—
同上	—	1	—	128	24	
同上	—	—	1	808	24	680
	对照——非专一吸附剂 (1N HCl 洗脱)					
结合酪蛋白 3 毫克	—	—	1	36	36	
结合白蛋白 3 毫克	—	—	1	1950	36	1914

(据 Незлин, 1972)。

剂，加入定量的相应的抗血清或抗体溶液，经过短暂保温后，将专一吸附的抗体洗脱，并测定洗脱液中蛋白质含量，即为抗体量（表 11-14）。常用的固相载体有溴乙酰纤维素（Gill 和 Bernard，1969），CNBr 活化的琼脂糖珠（Porath 等，1967；Axen，等，1967），Sephadex 的异硫氰酸衍生物（Wide 和 Porath，1966）等。测定的灵敏度决定于最后一步中采取的测定蛋白质的方法。如用 Lowry 氏微量法，可测定 1 或<1 微克的抗体蛋白质。抗体体外合成实验中，有放射性标记氨基酸参入的新合成的抗体，或 ^{125}I 直接标记的抗体，借助闪烁计数器测量放射性，测定灵敏度可提高到毫微克 (ng) 水平。这一方法能够准确定量，灵敏度高，重复性好，操作简便，迅速（整个测定过程只需 2—3 小时）。抗原偶联在固相吸附剂上，排除了形成可溶性抗原抗体复合物的可能性，因而无论沉淀抗体和非沉淀抗体都可以测定。由于具有这许多优点，这一方法在抗体生物合成等生化实验中很有用处。此外，若加以适当改变还可以用于抗原测定。

(2) 抗原测定(“夹心”吸附剂法)

按上法制备专一的固相免疫吸附剂(纤维素-抗原)，再用同型免疫血清处理，洗去多余的血清，做成“夹心”免疫吸附剂[(纤维素-抗原)-抗体]。然后加入欲测定的含抗原的溶液，抗原便被“夹心”免疫吸附剂上结合的抗体专一地吸附，经洗涤去除未结合的抗原后，用洗脱液洗脱(使抗原抗体复合物解离)，测量洗脱液中蛋白质含量。以实验组的洗脱蛋白质量，减去对照组中洗脱的蛋白质量(免疫吸附剂-抗体 + 对照抗原，或另一种免疫吸附剂-抗体 + 测试抗原)，就可以得到专一结合的抗原量。如表 11-15 中，实验组抗原蛋白增加量为 37 微克/毫克吸附剂，减去非专一增加量 5 微克/毫克吸附剂，得到专一结合的抗原量为 32 微克/毫克吸附剂。通常 1 克“夹心”免疫吸附剂能专一地吸附 40—50 毫克抗原。所用抗血清，如改为纯化的抗体，结合能力还可提高 2—3 倍。

(3) 免疫吸附抑制法 (Immunoadsorbent-inhibition test)

利用非标记抗原对标记抗原和固相抗体(免疫吸附剂-抗体)结合的抑制反应，能够区别各种抗原之抗原性的微小差异。如果非标记抗原和标记抗原的抗原性略有不同，甚至当非标记抗原过剩时，仍不能完全抑制标记抗原和同型固相抗体的专一结合。这一方法在比较许多种蛋白质抗原(如同种异型抗原)的抗原性异同时，特别有用处。

表11-15 抗原的定量测定("夹心"吸附剂法)

抗马γ球蛋白免疫吸附剂,毫克	加入量		洗脱蛋白质(微克)	抗原蛋白增加量(微克)	1毫克吸附剂专一增加量(微克)	1毫克吸附剂非专一增加量(微克)
	0.85%NaCl(毫升)	蛋白质(微克)				
2	1.0	—	432	—	—	
	—	250(卵白蛋白)	442	10	—	5
	—	250(马γ球蛋白)	506	74	32	—

(据 Nezlin, 1972)。

免疫吸附抑制反应的抑制程度依赖加入的非标记抗原量,因此也可以用于抗原的定量测定(Mann, 1969)(图 11-29)。

以上这几种分离结合抗原和游离抗原的方法,在放射免疫中也得到广泛应用。下面要谈到的是不需要这种分离手续,直接测量抗原(半抗原)和抗体反应中所引起的荧光变化的方法,即荧光法。

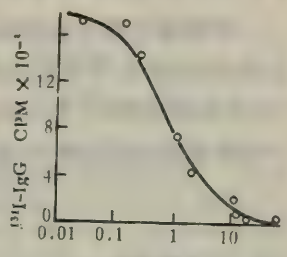


图 11-29 ^{131}I-IgG 和相应的抗体-吸附剂间的抑制反应对所加非标记同型抗原量的依赖关系。

4. 荧光法

荧光法的基本原理是抗体和抗原或半抗原分子相互作用时引起荧光强度或偏振程度的变化,可被荧光分光光度计或荧光偏振仪极灵敏地测定。因此,此类方法也属于初级相互作用测定法的范围。 除去本章已介绍过的荧光灭活法以外,下述两种荧光法在免疫化学研究中,也有重要的用途:

(1) *荧光加强* (Fluorescence enhancement)

某些半抗原分子,如萘磺酸衍生物,在溶液中无荧光,当和抗体结合后就呈现强荧光,并且在一定范围内荧光增强度和所加抗体量成比例。由此可测定抗体的量(图 11-30)。这一方法的优点是无需纯化的抗体,简便,灵敏。不过只限于少数在光谱性质上适合上述条件的抗原,应用范围因而很有限。

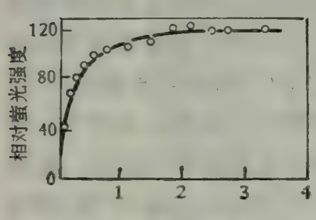


图 11-30 6-苯氨-萘-2-磺酸(6,2 ANS)和相应的抗体反应时的荧光加强。 发射荧光在 440 mμ 测量(据 Незлин, 1972)。

(2) *荧光偏振* (Fluorescence polarization)

在一定条件下,反应过程中分子大小和形状(不对称性)的改变能影响荧光偏振程度。这一原理也可应用于抗原抗体相互作用的研究。当一个半抗原或蛋白质抗原和抗体分子结合时,由于分子量的增加和形状的改变,勃朗运动速率降低而引起荧光偏振增加。抗原偏振程度随抗体浓度而定量地增高,并可用荧光偏振仪测出。

实际操作时,要求抗原先用其荧光发射光谱不被蛋白质基团干扰的荧光分子标记,并且欲测定成分的分子大小不应比测定物过小。此方法可应用于许多抗原抗体反应动力学和平衡的基本研究,如求结合常数,结合位点浓度,不均一性常数,化学反应级别,反应速度等。并且还具有操作简便,迅速,灵敏度高(可测量 0.4 微克/毫升抗体)等优点。主要的限制是如用全抗血清时,背景荧光过高, 因此最好用纯化的免疫球蛋白或抗体

(Dandliker 和 Saussure，1970)。

(二) 初级相互作用定性测定法

1. 根据抗原和不溶性抗原抗体沉淀物结合的方法

此方法主要应用于免疫球蛋白及其亚基对抗原结合的特性的研究。对于鉴别一个专一抗体属于何种免疫球蛋白类型，如反应素和 IgE 的关系，很有用处。

(1) 间接放射免疫电泳法

和微量免疫电泳相似，在载玻片上铺一薄层琼脂，按需要打孔和开槽。测试血清或血清成分(含有某种类型的专一抗体，如抗-BSA 的 IgG) 加在一侧样品孔内，对照样品(正常免疫球蛋白，如 IgG) 加在另一侧孔内。电泳以后，在槽内加能沉淀测试血清中的专一抗体免疫球蛋白的抗血清(如抗 IgG)，静置候其扩散，产生沉淀线。洗去多余抗血清，再加和专一抗体相应的 ^{131}I-标记抗原(如^{131}I-BSA)，再作一次扩散。放 24 小时后，洗涤去除多余的未结合抗原。将载玻片覆盖在 X 光感光胶片上显影，经 24—36 小时后，冲洗出底片，就可见到放射性图象(图 11-31)。

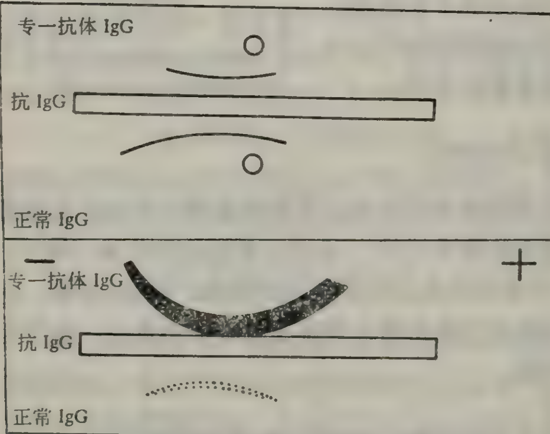


图 11-31

(2) 直接放射免疫电泳法

与上法唯一的不同之处，是将 ^{131}I-标记抗原和抗 IgG 血清同时加到槽内。此外，仿照上述原理还可以做放射免疫扩散(间接法和直接法)。所有这些方法都十分灵敏，如对于上述家兔抗-BSA 沉淀抗体 (IgG)，放射免疫电泳可检测出和每毫升抗-BSA 结合的抗原量为 0.025 μgN，而放射免疫扩散能检测出的结合量低至 0.003 μgN。但是，应注意到这些方法的缺点是有时出现非专一的反应。如上图所示，免疫电泳图上方的专一抗体 IgG 沉淀弧显现很强的放射影象，而下方正常 IgG 沉淀弧也显现一条淡的，但清楚的影象。这种假象产生的原因可能是由于上方孔内的专一抗体 IgG 分子扩散到另一方，混入正常 IgG 和抗 IgG 形成的沉淀弧，并与 ^{131}I-BSA 结合的缘故。所以，为了避免产生这种假象，放射免疫电泳的载玻片上最好只放含专一抗体的一种样品；在放射免疫扩散中，相邻的孔不要放有交叉反应或部分交叉反应的样品。

2. 免疫萤光法(萤光标记抗体法)

免疫萤光法是一种初级定性测定方法，可以观察和精确地测定组织和细胞内微量抗

原抗体反应的位置。其原理是用一种萤光染料异硫氰萤光素（Fluoresein isothiocyanate，简称 FITC）与抗体结合。然后用这种萤光标记的专一抗体染冰冻的或冰干的组织切片或涂片。结果标记的专一抗体便和组织细胞内相应的抗原在原位结合。洗涤去除不结合的抗体。用萤光显微镜观察，在紫外光（或蓝紫光）的激发下，有萤光标记抗体结合的部位便呈现绿色萤光（520 mμ）。这种方法称为直接萤光抗体法（Coons 等，1941）（图 11-32，A）。这一方法的灵敏度很高，据估计在 5 微米厚的组织切片内可检测出大约 1.4×10^{-4} 微克/毫米^{2}浓度的抗原。

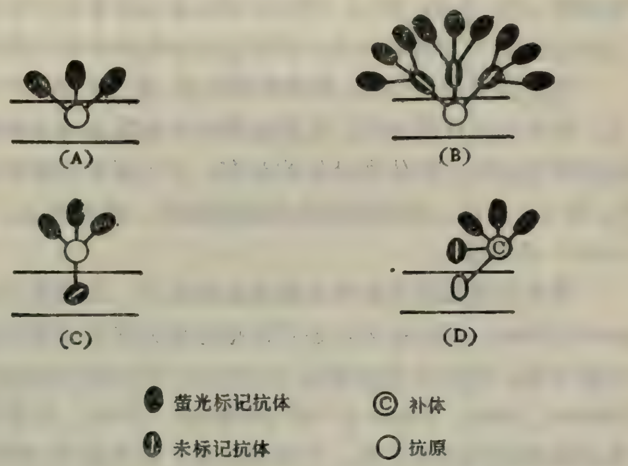


图 11-32 几种萤光标记抗体对组织细胞内抗原和抗体定位方法示意图。(A) 直接法：萤光标记的专一抗体直接和组织内的抗原结合。(B) 间接法(双抗体法)：组织内抗原先和未标记的专一抗体结合，然后再和萤光标记的抗体（羊抗兔 IgG）结合。(C)"夹心法"：组织内抗体先和抗原专一地结合，再和萤光标记的专一抗体结合。(D) 有补体参加的间接法：组织切片经专一抗体加补体(新鲜的豚鼠血清)处理后，再用萤光标记的抗豚鼠补体的抗体显示被固定的补体（据 Humphrey 和 White，1963）。

后来又加以改进为间接萤光抗体法(双抗体法)。组织切片内的抗原先和未标记的专一抗体结合，洗涤去除过剩的抗体后，再用萤光标记的第二

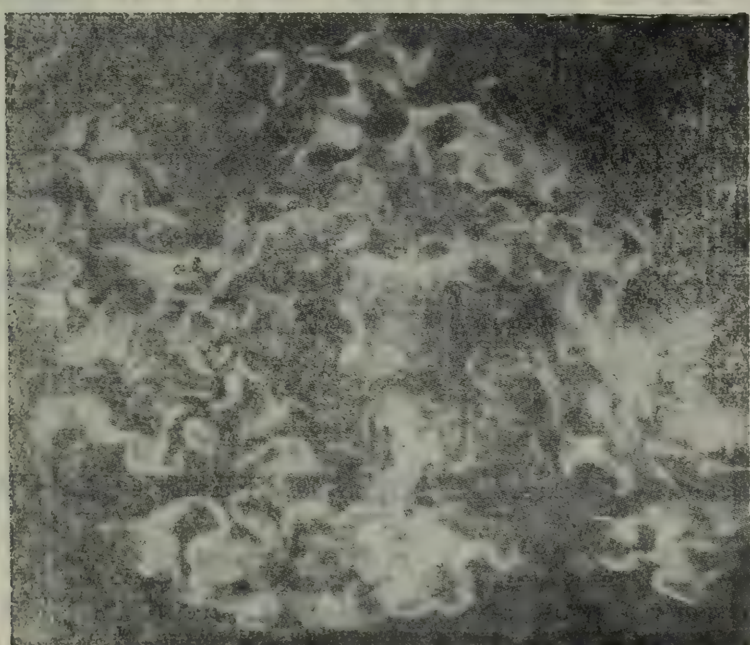


图 11-33 自体免疫增生性肾小球炎病人（Goodpasture's disease）之肾小球的免疫萤光。组织切片经萤光标记的兔抗人 IgG 抗体处理。专一的萤光表示 IgG 沿肾小球微血管壁沉积（据 Lerner 等，1967）。

抗体（羊抗兔γ-球蛋白）处理，使和专一抗体结合。结果在抗原和抗体反应的位置便呈现萤光（图 11-32，B）。间接法除比直接法更为灵敏外，另一优点是只需要制备一种萤光标记的抗γ球蛋白抗体，便可以用来检测多种抗原的同种的抗血清。

免疫萤光法对细菌、病毒等微生物、原生动物、寄生虫以及动物组织抗原的鉴定和定位，组织内抗体的定位，以及血清抗体的鉴定等方面得到广泛的应用。利用免疫萤光法测定病理切片上抗体和补体的存在，对于鉴定组织的免疫损伤也有重要意义（图 11-32，C；图 11-33）。关于萤光免疫法的制片、萤光标记、染色以及应用可参看 Kawamura（1969）的专著。

用含重金属原子即电子密度高的分子，如铁蛋白和辣根过氧化物酶（Horse-radish peroxidase）标记抗体，还可以把这种方法扩大到借助电子显微镜观察，在分子水平对抗原定位，称为免疫电镜术（Immuno-electronscopy）（Singer，1975；Nakane 和 Pierce，1966；Kawarai 和 Nakane，1970）。免疫电镜术在免疫学研究中，特别是细胞表面抗原和受体方面，正得到日益广泛的应用（参看第十三章，图13-4b）。

（三）初级测定与次级和三级测定的比较

区分初级、次级和三级测定不但在理论上是重要的，而且在临床医学上也有实际意义。现举一个例子来说明。饮用牛奶的人中有一部分产生过敏反应，血液中出现牛奶中含有的一种蛋白质，牛血清白蛋白（BSA）的抗体。有人对 15 个病人以及两只家兔血清中的 BSA 抗体，用各种方法进行系统地比较分析，结果列于表 11-16。所采用的方法中，硫酸铵法（ABC-33）和放射免疫电泳法属于初级测定；P-80、血凝反应和琼脂扩散属于次级测定；被动皮肤过敏反应（PCA）和 P-K 反应属于三级测定。现分述如下：

1. 初级反应

如前述，硫酸铵法测定血清中抗体对抗原的结合能力，当 0.02 微克N/毫升 标准抗原浓度时，可用每毫升未稀释血清结合的^{131}I-BSA 微克表示。放射免疫电泳能定性地指出专一抗体所属的免疫球蛋白类型。从表 11-16 可见，硫酸铵法测定结果所有血清都呈阳性，同时所有^{131}I-BSA 都和 Ig G 结合，而 5/15 样品和 IgA 结合。也就是两种初级测定都证明有专一抗体存在，并且所有样品均含属于 Ig G 类型的抗体，5/15 含有属于 IgA 的抗体。

2. 次级反应

虽然两种初级测定都呈阳性反应，而次级反应从下述结果可见往往呈阴性反应。

（1）抗原沉淀能力（P-80 法）

^{131}I-BSA 标记抗原加入到一系列稀释的抗血清中，以达到 80% 标记抗原沉淀的稀释度作为终点，再换算成每毫升未稀释血清沉淀的微克 ^{131}I-BSA N，作为 P-80 值（Talmage 和 Maurer，1953）。

从表11-16 可见，14 个血清样品中，7 个 P-80 测定为阴性。其余 7 个中，3 个达到P-

表 11-16 人和家兔各种抗体测定方法的比较

	人血清															家兔血清[a]	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	a[b]	b[c]
ABC-33, 0.02 微克 ^{131}I BSAN/ml	11.6	6.07	5.02	4.62	2.77	1.52	1.24	0.96	0.96	0.77	0.66	0.45	0 37	0.34	0.31	3.83	5.94
放射免疫电泳																	
抗全血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
抗-γA	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	?	?
抗-γM	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	?	?
抗-γG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%沉淀抗原	–	>80	36.4	>80	>80	–	63.3	32.9	–	45.4	–	–	–	–	–	>80	>80
p-80, 0.02 微克 ^{131}IBSA N/ml	–	0.70	–	1.28	0.32	–	–	–	–	–	–	–	–	*d	–	0.67	2.24
p-80/ABC-33	–	0.11	–	0.28	0.12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.17	0.38
血凝反应	1/64	1/32	1/256	1/512	1/256	1/16	0	1/32	1/64	1/32	1/128	0	0	0	0	1/4096	1/2048
琼脂扩散	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
PCA	–	–	–	–	*d	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
P-K	+	*d	+	+	–	–	–	–	*d	–	–	*d	+	–	–	*d	*d
年龄	17	17	8	18	6	19	39	3	61	46	3	44	34	8	78		
临床诊断 e	1	1.2	1	1	1	3	4	3	5	3	3	6	1,3	1,3	4		

a 稀释 1: 10， b 经四种途径免疫， c 口服免疫， d* 未测定 e 诊断具有下列和牛奶、牛肉过敏无关的症状的病人：
1 为过敏性鼻炎， 2 为局部肠炎， 3 为气喘， 4 为神经性皮炎， 5 为高血压， 6 为肠功能紊乱。
（据 Minden，等 1967）。

80 终点，4 点只有极微弱的沉淀反应。和硫酸铵法的结果比较，^{131}I-BSA 结合能力最高的样品，却反而测不出沉淀能力。由此可见，两种方法的相关性很差。

(2) 抗原沉淀率

若用 P-80 /ABC-33 比值来表示一个抗血清的抗原沉淀效率，就可以清楚看出人抗血清的抗原沉淀效率比家兔抗血清低。这不只是见于 BSA-抗 BSA 系统，在 M-12 链球菌提取物系统也可观察到这一现象。

(3) 琼脂扩散

从表 11-14 可见，人血清中只有沉淀效率最高的样品 (4 号) 才出现沉淀线。这说明琼脂扩散比 P-80 法的灵敏度差，并且高沉淀效率有利于在琼脂内产生沉淀线。

(4) 血凝反应

结果表明，血凝反应的灵敏度较高，15 个人血清样品中有 10 个呈阳性反应，但是和其他方法之间同样缺乏相关性。 此外，虽然有的人血清样品的抗原结合能力比家兔高，家兔血清的凝集效价一般都比人血清高。已知不同种类抗体的血凝效率有所不同，Ig M 抗体比 IgG 高，而抗原结合能力则正相反。因此，上述现象可能是由于家兔和人血清中所含的两类抗体的比例不同所致。

3. 三级反应

(1) 被动皮肤过敏反应 (PCA)

豚鼠皮内注射 0.1 毫升测试血清。16 小时后再静脉注射 BSA 抗原和 Evan 氏蓝的混合溶液，观察 45 分钟内局部的反应。若反应不明显，可杀死动物并剥皮。检查皮肤内面，注射抗体部位有无染料浓集。用这一方法测试的结果表明，14 个经测试的人血清样品都无 PCA 活力，而家兔血清表现强的 PCA 活力。

表 11-17 初级测定和次级、三级测定的比较

	测定例数	阳性例数
初级测定		
硫酸铵法	15	15
放射免疫电泳法	15	15
次级测定		
p-80	14	3
琼脂扩散	15	1
血凝反应	15	10
三级测定		
PCA	14	0
p-k	12	4
饮牛奶后的临床症状	15	0

(2) Prausnitz-Küstner 反应 (P. K.)

将0.1毫升测试血清皮内注射到先经皮试呈阴性的受试人体背部，48 小时后再注射测试抗原 (BSA)，20 分钟后观察结果。这一方法限于异位性过敏病人，血清中反应素抗体 (IgE) 的测定(参看第九章,249页)。从表 11-15 可见，已测试过的人血清样品中，只有 4 个呈阳性反应。但是，值得注意的这四个呈阳性反应的病人，在吃牛奶或牛肉后，都并没有表现可观察出的临床过敏症状。在其他抗原抗体系统，也发现过用抗原皮试时呈现专一的立即型阳性反应，但不一定伴有过敏症状。

上述各种初级、次级和三级测定的相互关连，总结在表 11-17 中。虽然用两种初级测定，所有人血清样品都呈阳性反应，但是次级测定却往往呈阴性反应；三级测定和初级测定的关系更为间接，同样不能提供是否有抗体存在的确定的知识。既使在二级、三级反应呈阳性时，这些测定结果和存在的抗体量之间也没有确定的相关性。这再一次强调说明，次级反应中抗体的性质，三级反应中还要加上寄主整体因素对反应结果的表现的重要性。由于次级、三级反应的复杂性，甚至当用初级反应测出有大量抗体存在时，仍不能用次级或三级方法测出。这些事实提示我们，在研究有无抗体存在和测定抗体的量的实验中，设计实验时应注意采用几种方法，最好至少包括一种初级测定法。免疫化学研究中，抗体的生物合成等最好采用专一的免疫吸附剂法，半抗原抗体相互作用的动力学和化学平衡的研究，多采用萤光法。次级和三级反应的其他一些方法，如血凝反应，补体结合与 PCA 反应等，仍然得到广泛的应用，不过在解释结果时，应当了解其局限性。

参 考 资 料

一般参考书

Abramoff, P. and Lavia, M. F. (1970). Biology of immune response, McGrew-Hill Book Co., Chapter 12.

Day, E. D. (1972). Advanced Immunochemistry. The Williams & Wilkins Company/Baltimore.

Haurowitz, F. (1968). Immunochemistry and the biosynthesis of antibodies, Interscience Publishers Chapter IV.

Pressman, D. and Grossberg, A. L. (1968). The structural basis of antibody specificity, W. A. Benjamin, Inc

论文和专著

免疫复合物形成机制

Heidelberger, M. (1956). Lectures in Immunochemistry, Academic Press.

Marrack, J. R. (1938). The chemistry of antigens and antibodies, Chapter 12.

Munn, e. A., Feinstein, A. and Munro, A. J. (1971). Electron microscope examination of free IgA molecules and of their complexes with antigen. *Nature* 231, 527.

Steensgaard, J. and Funding, L. (1974). On the formation of a reaction scheme for the interaction between an antigen and its antibody. *Immunol.* 26, 299.

Steensgaaard, J., Johansen, H. K. W. and Moller, N. P. H. (1975). Computer simulation of immunochemical interactions. *Immunol.* 29, 571.

抗体分子和半抗原的结合

Amzel, L. M. et al. (1974). The three dimensional structure of a combining region ligand complex of immunoglobulin new at 3.5Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) 71, 1427.

Cameron, D. J. and Erlanger, B. F. (1977). Evidence for multispecificity of antibody molecules. *Nature* 268, 763.

Eisen, H. N. and Siskind, G. M. (1964). Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3, 996.

Fugio, H. and Karush, F. (1966). Antibody affinity. II. Effect of immunonization interval on antihapten antibody in the rabbit. *Biochemistry* **5**, 1856.

Haselkorn, D., Freidman, S., Givol, D. and Pechet, I. (1974). Kinetic mapping of the antibody combining site by chemical relaxation spectrometry. *Biochemistry* **13**, 2210.

Imanishi, T. and Mäkelä, O. (1973). Strain differences in the fine specificity of mouse anti-hapten antibodies. *Eur. J. Immunol.* **3**, 232.

Karush, F. (1963). Immunologic specificity and molecular structure. *Advan. Immunol.* **2**, 1.

Kreiter, V. P. and Pressman, D. (1964). Antibodies to a hapten with two determinant groups. *Immunochemistry* **1**, 151.

Leslie, R. G. Q. and Cohn, S .(1973). The active sites of Ig molecules. In: ''Essays in fundamental immunolgy'', ed. Roitt, J., p. 1, Blackwell Sci. Publ.

Padlan, E. A., Davies, D. R., Rudikoff, S. and Potter, M. (1976). Structural basis for the specificty of phosphorylcholinding immunoglobulins. *Immunochem.* **13**, 945.

Pecht, I. (1974). Kinetic mapping of antibody binding sites. In: ''The immune system: genes, receptors, signals'', ed. E. E. Sercarz, A R. Williamson and C. F. Fox. p. 15.

Pressman, D., Siegal, M. and Hall, L. A R. (1954). The closeness of fit of antibenzoate antibodies about haptens and the orientation of the haptens in combination. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 6336.

Richards, R. F., et al. (1974). Polyfunctional antibody combining regions. In: ''The immune system; genes, receptors, signals'', p. 53.

Secher, D. S. (1977). Multispecific antibodies. *Nature* **268**, 689.

Segal, D. M., et al. (1974). The structure of McPC603 Fab and its hapten complex. In: ''Progress in immunol. II., V I. Immunochemicall aspects, p. 93.

Tengerdy, R. P. (1966). Equilibrium and kinectic studies of the reaction between conalbumin and anticonalbumin. *Immunochemistry* **3**, 463.

颗粒抗原的凝集作用

Coombs, R. R. A., Mourant, A. and Race, R. (1945). A new test for detection of weak and ''incomplete'' Rh agglutinins. *Brit. J. Exp. Pathol.* **26**, 255.

Grubb, R. (1970). The genetic markers of human immunoglobulins, Springer.

Stavitsky, A. B. (1954). Micromethods for the study of protein and antibodies. I. Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood cells. *J. Immunol.* **72**, 360.

van Oss, C. J. and Mohn, J. F. (1970). Scanning electron microscopy of red cell agglutination. *Vox Sangunis* **19**, 432.

抗体的测定

Catt, K. and Tregear, G. W. (1967). Solid phase radioimmunoassay in antibody coated tubes. *Science* **158**, 1570.

Dandliker, W. B. and de Saussere, V. A. (1970). Fluorescence polarization in immunochemistry. *Immunochemistry*, **7**, 799.

Farr, R. S. (1958). A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between I* BSA and antibody. *J. Infect. Disease* **103**, 239.

Gill, T. J. (1970). Methods for detecting antibody. *Immunochemistry* **7**, 997.

Gill, T. J. and Bermard, C. F. (1967). Quantitative micro-method for measuring antibody utilizing the bromoacetyl cellulose immunoadsobant. *Immunochemistry* **6**, 567.

Herbert, V., Lau, K.-S., Gettlieb, C. W. and Bleicher, S. J. (1956). Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Cin. Endocrinol.* **25**, 1375.

Mann, D.,Granger, H., and Fahey, J. L., (1969). Use of insoluble antibody for quantitative determination of small amount of immunoglobulin. *J. Immunol.* **102**, 618.

Meyer, V. and Knobil, E. (1967). Growth hormone secretion in the unanaesthetized rhesus monkey in response to novious stimuli *Endocrinol.* **80**, 163.

Minden, P., Reid, R. T. and Farr, R. S. (1966). A comparison of some commonly used methods for detecting antibodies to bovine albumin in human serum. *J. Immunol.* **96**, 180.

Rosselin, G., Assan, R., Yalow, R. S. and Berson, S. A. (1966). Separation of antibody bound and unbound peptide hormones labelled with iodine-131 by talcum powder and precipited silica. *Nature* **212**, 355.

Schalch, Don, S. and Parker, M. L. (1964). A sensitive douible antibody immunoassay for human growth hormone in plasma. *Nature* **203**, 1141.

Singer, S. J. (1975). Present capabilities and future prospects of high resolution immunoelectron

microscopy. *Immunochem.* **112**, 615.

Skom, L. H. and Talmage, D. W. (1958). The role of nonprecipitating insulin antibodies in diabetes. *J. Clin. Invest.* **37**, 787.

Wide, L. and Porath, J. R. (1966). Radioimmunoassay of proteins with the use of sephadex-coupled antibodies. *B. B. A.* **130** 257.

Yoo, T. J., Nakamura, H., Grossberg, A. L. and Pressman, D. (1970). Antibody-ligand interactions studied by fluorescence enhancement methods. I. Properties of the ligands 4-anilinona phthaline-1-sulfonate and 6-aninonaphthaline-2-sulfonate. *Immunochemistry* **7**, 627.

[附录] 放射免疫测定的原理及其应用

血清中蛋白质和多肽激素的含量极微，通常在1—100×10⁻¹² 克分子浓度 范 围（表

表1 血浆内一些激素的浓度

激　　素	克 分 子 浓 度
甲状腺素	$100,000\times10^{-12}$
氢化皮质酮	$100,000-500,000\times10^{-12}$ (p.m)　(a.m.)
胰岛素	100×10^{-12}
升血糖素（Glucagon)	100×10^{-12}
生长素	60×10^{-12}
副甲状腺激素	30×10^{-12}
ACTH	$1-10\times10^{-12}$ （午后）（午前）

（据 Yalow & Berson, 1968)。

表2 放射免疫法的应用范围

蛋白质和多肽激素	非 多 肽 激 素	非 激 素 类 物 质
胰岛素	醛甾酮	Intrinsic factor
生长素	睾酮	异羟基洋地黄毒苷
ACTH	双氢睾酮	
副甲状腺素	雌二醇	洋地黄毒苷
升血糖素	雌三醇	吗啡
TSH	雌酮	环核苷酸:
HCG	2-羟雌酮	cAMP, cGMP
FSH	前列腺素	cIMP,cUMP
LH	三碘甲状腺素	C_1 酯酶
HCS		葡萄糖-1,6-二磷酸
前胰岛素		类风湿因子
Secretin		人 IgG
加压素		叶酸
催产素		Neurophysin
血管紧张素		TBG
缓激肽		尿白蛋白
甲状腺球蛋白		
α-MSH		乙型肝炎抗原
β-MSH		
促胃液素		肿瘤抗原:
甲状腺降钙素		CEA
前胰岛素		α-FG
C-肽链		
PZ-CCK		

（据 Yalow 和 Berson, 1971)。

1)。过去所用的免疫学测定法，显然不能适应这方面研究工作的需要。

从 Berson 和 Yalow (1959) 首先报道了放射免疫测定法的基本原理和定量测定血浆中胰岛素含量的结果以来，这一方法由于具有专一性强、灵敏度高等多方面的优点，因此受到很大的重视并取得了很大的发展。目前已经建立了许多种激素(蛋白质、多肽、甾体和前列腺素)和某些非激素的生物活性物质(核苷酸、维生素等)的放射免疫超微量测定法，灵敏度达到毫微克 (ng)，以至微微克 (pg) 水平。这对其他学科，如内分泌学和生殖生理学等的发展起了很大的促进作用，而且在临床上(如妇女正常月经周期内和疾病时激素水平的变化，肿瘤和肝炎的诊断等)也得到越来越广泛的应用(表 2)。

这里只打算从已讲述过的抗原抗体相互作用理论来阐明放射免疫的简单原理和有关的一些理论问题。要求对方法学作进一步的了解时，可参考下述著作和综述：Odell 和 Daughaday (1971)，Berson 和 Yalow (1973)，Peron 和 Caldmell (1970)，Bagshawe (1974)。

(一) 基 本 原 理

放射免疫的基本原理是根据欲测定的未标记抗原 (Ag)，对放射性同位素标记的抗原 (Ag^*) 与其相应的专一抗体 (Ab) 的结合的竞争性抑制作用。在图 1 所示的反应系统中，当 Ag^* 和 Ab 的含量保持恒定，则标记的抗原抗体复合物 (Ag^*-Ab) 的形成量是受未标记抗原 (Ag) 的量制约的。如欲测定的未标记抗原的量减少，Ag^*-Ab 复合物的形成量就增多；反之，如 Ag 含量增多，则 Ag^*-Ab复合物形成量就减少。也就是说，Ag^*-Ab 复合物形成量是 Ag 含量的函数。因此，从 Ag^*-Ab 复合物形成量，就能够推算出欲测的 Ag 含量。Ag^*-Ab 复合物可用不同方法从上述反应系统中分离出来(参看第十一章323页)，测定其放射性强度。由于标记的放射性复合物可极为灵敏地测定出来 (特别是采用液体闪烁计数器时)，因而大大提高了这一方法的灵敏度。目前利用放射免疫法对血清中激素含量的测定达到 ng-pg 水平。

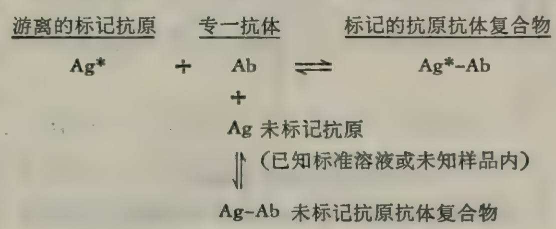


图 1　放射免疫法根据的竞争结合反应。

Ag^*-Ab 复合物和 Ag 间的特定函数关系可用图示法(“标准曲线”)表示。为方便起见，制定“标准曲线”时，通常用结合的和游离的标记抗原的比值 B/F 值来表示剂量反应关系。其中，B = 和抗体结合的标记抗原浓度，F = 游离的(未结合的)标记抗原浓度，并假定 b 和 f 分别代表结合的标记抗原和游离的标记抗原的比率，因此 $b+f=1$。在图 1 所示的反应系统中，当未标记抗原的浓度 [H] 增加时，Ag^*-Ab 减少，也就是说，结合的标记抗原的比率 (b) 降低，而未结合的标记抗原的比率 (f) 相应地增高。因此，可以用 B/F, b, f, 或 $1/b$ 中的任一量对加入反应系统的已知的未标记抗原量 [H] 作图，制定标准曲线(图 2)。未知样品内的激素或其他欲测定的抗原量，可根据实验操作中分离结合的和游离抗原后，实际测量得到的标记抗原的结合程度(以 B/F, b, f, 或 $1/b$ 表示)，

从相应的标准曲线上查出。如图 2，人胰岛素测定系统中，如某一未知血清样品，实测的 $B/F=0.82$，从 B/F 对 H 作图的标准曲线上可查出该未知样品之胰岛素含量为 0.1 毫微克/毫升。同理，若用 f, b, $1/b$ 表示，从相应的标准曲线也可得出同样的结果。由于放射免疫所测量的是结合的和游离的标记抗原的放射性的比值 (B/F)，因此实际操作中由于吸量而产生的误差不会影响实验的结果，因而增加了测定的精密度。

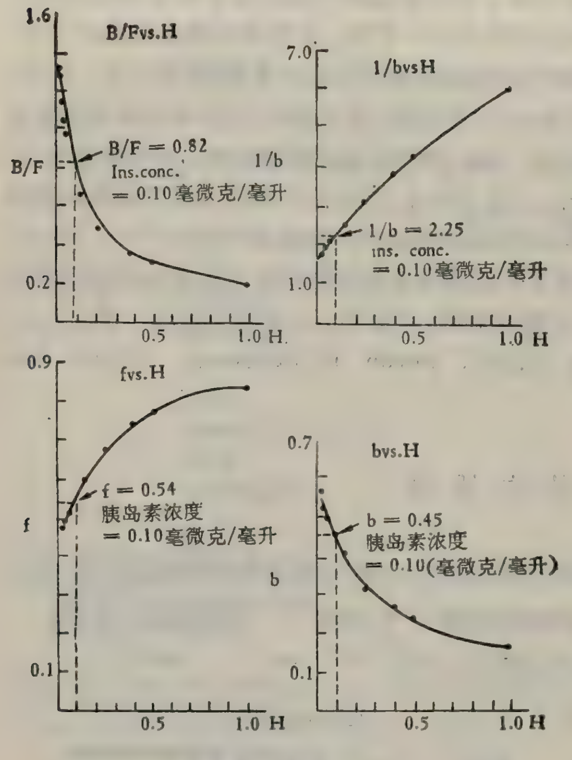


图 2 人胰岛素的标准曲线，示未知样品中胰岛素浓度的计算法（据 Bearson 和 Yalow, 1969）。

（二）几个理论问题

对于放射免疫测定的灵敏度 (Sensitivity)、精密度 (Precision) 和专一性 (Specificity)，抗血清的品质有决定性影响。这要求抗血清有适当的效价、专一性和亲合力。一个抗血清中的专一抗体含量，及其对抗原的亲合力的大小，在不同的免疫动物之间，有明显的个体差异，甚至同一个体在免疫过程中也有变化。因此，应当挑选最适合的抗血清。通常这是通过抗血清最适稀释度的滴定来选择的。品质好的抗血清经过适当稀释后，在有微量标记抗原存在的条件下，其 B/F 比值在 0.5—1.0 时，标准曲线的斜率最大，亦即灵敏度最高。目前还没有制备品质好的抗血清的完全可靠的方法。最好的办法仍然是多免疫一些动物，从其中进行挑选。方法的专一性、可靠性、灵敏度和精密度也主要靠实验验证。然而，下述理论方面的了解对于进行这些实验工作是有一定的指导意义的。

1. 专一性概念

在一个放射免疫测定系统内，如下图所示：

$$\begin{array}{l} Ab_1 \cdot H_1 \\ Ab_2 \cdot H_2 \\ Ab_3 \cdot H_3^* + H_3 \rightleftharpoons Ab_3 \cdot H_3 + H_3^* \\ Ab_4 \cdot H_4 \\ Ab_5 \cdot H_5 \end{array}$$

所用的抗血清含有多种抗体，包括对其他激素或非激素物质（如 H_1, H_2, H_4, H_5）的抗体，仍然可以作为供激素 H_3 的放射免疫测定的专一抗血清，只要 Ab_1, Ab_2, Ab_4, Ab_5

不和 H_3^* 结合(交叉反应)就行。因此,所谓专一性是指 H_3 和 H_3^* 对相应抗体 Ab_3 竞争结合的专一性,而不依赖于此抗血清是否为有"单专一性"的(mono-specific)抗血清。这一抗血清所含的各种抗体,如能与 H_1, H_2, H_4, H_5 和相应的标记抗原各自专一地竞争结合,也可能作为这些抗原的专一的测定系统。

反之,如一放射免疫测定系统中,如下图所示:

$$Ab_3 \cdot H_3^* + \begin{cases} H_2 \rightleftharpoons Ab_3 \cdot H_2 + H_3^* \\ H_3 \rightleftharpoons Ab_3 \cdot H_3 + H_3^* \\ H_4 \rightleftharpoons Ab_3 \cdot H_4 + H_3^* \end{cases}$$

其中抗血清只含有一种抗体(Ab_3),也不能作为一个专一的测定系统,因为 Ab_3 和 H_3^* 的结合不仅受到未标记的 H_3 竞争,而且还受未标记的 H_2, H_4 竞争。在这一系统中,即使只有一种抗 H_3 抗体(Ab_3)存在,仍然不是专一的。

实践上,一个放射免疫测定系统的专一性首先决定于所测抗原和其他抗原之间有无交叉反应。如 HCG 测定系统特别要注意和 FSH、LH、TSH 的交叉反应,因为这些激素分子的 α 亚基存在交叉反应的决定簇(参看第一章 60 页)。至于抗血清所含抗体是否是单一的,并不重要,因此不需要高度纯化,相应地免疫原也不一定需要高度纯化。一般说来,血清样品无需分离就可直接作测定。甾体激素的放射免疫测定,目前还很难得到绝对专一的(无交叉反应的)抗血清,因此血清样品在测定前还需用简便的方法进行初步分离。

2. 最大灵敏度与最大精密度的条件

假定标记和未标记抗原分子在反应系统中的行为是相同的,均遵守质量作用定律,并且为均一的单价抗原和均一的抗体结合位点之间的双分子反应,则测定系统中的基本反应如下式所示:

$$\underset{(未结合抗原)}{[Ag]} + \underset{(未结合抗体)}{[Ab]} \underset{K'}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} \underset{(结合的抗原)}{[Ag \cdot Ab]} \qquad (1)$$

并设 F = 未结合抗原 [Ag] 的克分子浓度

B = 结合的抗原 [Ag·Ab] 的克分子浓度

[Ab] = 未结合的抗体结合位点之克分子浓度

[Ab°] = 全部抗体结合位点之总克分子浓度

= [Ab] + [Ag·Ab]

则 (1) 式的平衡常数(即亲合力常数)

$$K = \frac{K}{K'} = \frac{[Ag \cdot Ab]}{[Ag][Ab]} = \frac{B}{F([Ab^\circ] - [Ag \cdot Ab])} = \frac{B}{F([Ab^\circ] - B)}$$

移项可得到

$$\frac{B}{F} = K([Ab^\circ] - B) \qquad (2)$$

如设 $[H]$ = 抗原的总浓度

b = 结合抗原的比率

按定义则 $B = b[H]$

$$\frac{B}{F}=\frac{b}{(1-b)}=K([\mathrm{Ab}^\circ]-b[H]) \quad (2a)$$

从 (2a) 可见，当结合抗原浓度 $B=b[H]$ 增加时，B/F 就减少。但是，如果 $b[H]$ 比 $[\mathrm{Ab}^\circ]$ 小得太多，对于同样的 $[H]$ 的增加，B/F 的减少就很难测出。因此，要求所用的抗血清高度稀释，以减少抗体结合位点总浓度 $[\mathrm{Ab}^\circ]$ 到至少不比 $[H]$ 大得太多的程度(免疫血清内抗体浓度通常在 0.1—2 毫克/毫升。若以 2 毫克/毫升计算，抗体结合位点的总克分子浓度应为 $24.0\mu M$，而血清中激素的浓度仅有 $1—100\times10^{-9}\mu M$。这就是抗血清必须高度稀释的原因)。实际操作时，通常是选择在没有加未标记抗原，只有微量标记抗原存在的条件下，$B/F=1.0$ (即 50% 标记抗原结合)时的血清稀释度，作为最适稀释度。如微量标记抗原的浓度极低，因而可忽略不计，即 $[H]\to0$。因此 (2a) 可简化为：

$$1\leqslant K[\mathrm{Ab}^\circ]$$

于是，如果将抗血清高度稀释到足够程度，使 $[\mathrm{Ab}^\circ]=[H]$，并且仍然适合 $B/F=1$ 条件时，就必须满足下述条件

$$1\leqslant K[H] \quad \text{或} \quad K\geqslant\frac{1}{[H]}$$

在上述选择条件下，抗原(激素)浓度为 $[H]$，可以证明，如果 $K=\frac{1}{[H]}$，则 B/F 比值将降低约 37.5%，而此 K 值若再减小 10 倍 B/F 比值就只降低 5% 了。因此，对于任何一个抗血清存在一个内在的灵敏度的限制，这主要依赖于该抗血清中主要的专一抗体之亲合力常数 K 的值。如人抗牛胰岛素抗血清之最高 K 值 $=10^9$ 升/克分子，因此，最好的这种抗血清所能测定的浓度极限为 $10^{-9}M$。

(1) 最大灵敏度的条件

按照 Berson 和 Yalow (1971)，放射免疫测定的灵敏度可定义为剂量反应曲线 (b 对 $[H]$) 的斜率。若用函数 $b=f([H])$ 表示此曲线时，函数 b 的导数 $b'=\frac{db}{d[H]}$ 表示曲线的斜率。按此定义，最大灵敏度的条件，也就是该曲线的最大斜率，或 $b'=\frac{db}{d[H]}$ 为最大值时的条件。

从 (2a) 式两侧微分，简化后得出：

$$b'=\frac{db}{d[H]}=\frac{-Kb(1-b)^2}{1+K[H](1-b)^2} \quad (3)$$

从 (3) 式可见，对任一 b 值，当 $[H]\to0$ 时，斜率 $b'=db/d[H]$ 可能趋向一个最大值。为了求出最大灵敏度的条件，当 $[H]\to0$ 时，可使 (3) 式右侧的导数 $=0$。由此得到

$$\frac{d}{db}[-Kb(1-b)^2]=0$$

$$-K(1-b)^2+2Kb(1-b)=0$$

简化后得出

$$3b^2-4b+1=0 \quad (4)$$

解 (4) 式

$$b=\frac{4\pm\sqrt{16-12}}{6}$$

$$\therefore b=1/3 \quad 或 \quad 1$$

当 $b=1/3$ 时，有一最大值，$b=1$ 时，有最小值。因此，对于任一 b 值，当 $[H]\to 0$，灵敏度趋向于最大值；而在 $b=1/3$时，也就是当

$$\frac{db}{d[H]}=\frac{-4K}{27} \quad (3a)$$

时，灵敏度最大。总之，灵敏度是 K 的函数，由 K 决定的。

设实验条件下所能测的激素的最小浓度为 ΔH。在上述最适条件下，即$[H]\to 0$，$b=1/3$ 时，若所用抗血清的亲合力常数 $K=10^{12}$ 升/克分子。则由 (3a) 可得出

$$\Delta H=\Delta b\Big/\left(\frac{-4K}{27}\right)=0.02/(0.148\times10^{12})=1.35\times10^{-13}(克分子/升)$$

(2) 最大精密度的条件

如一激素浓度为 $[H]$，其测定的绝对测不准度为 $\Delta[H]$，则该测定的相对测不准度应为 $\frac{\Delta[H]}{[H]}$。求最大精密度的条件，就是求对于一定的剂量反应变化 Δb，相对测不准度有最小值的条件。由此，可以把精密度定义为 $\frac{db}{\left(\frac{d[H]}{[H]}\right)}$，并求出此函数有最大值的条件。

由 (3) 式乘 $[H]$，得出

$$\frac{db}{\left(\frac{d[H]}{[H]}\right)}=\frac{-bK[H](1-b)^2}{K[H](1-b)^2+1}=\frac{-b}{1+\left(\frac{1}{K[H](1-b)^2}\right)} \quad (5)$$

对于一定的 b 值，当 $[H]$ 增加时，此函数值也增加，并当 $K[H](1-b)^2\gg1$ 时，达到最大值。此时

$$\frac{db}{\left(\frac{d[H]}{[H]}\right)}=-b \quad (6)$$

或由 (6) 式积分，得到 $\ln b=\ln[Ab^\circ]-\ln[H]$ (7)

因此，理论上最大精密度在$K[H](1-b)^2\gg1$ 条件下，和 K 值无关，也就是对所有抗体都是一样的。其次，还可以证明后一条件表明 $K[Ab^\circ]\gg\frac{b}{(1-b)}$。因此，最大精密度要求抗体和激素的浓度都相当高。这些都是和最大灵敏度不同的，后者是 K 的函数，并在 $[H]\to 0$ 的条件下得到的。虽然如此，但从最大精密度的条件 $K[H](1-b)^2\gg1$，仍可看出，对于得到一定的精密度，K 值愈高，所需的 $[H]$ 浓度愈小。

3. 亲合常数的估计

由上述已知，最大灵敏度依赖于亲合力常数 K。为了选择最合用的抗血清和确定放

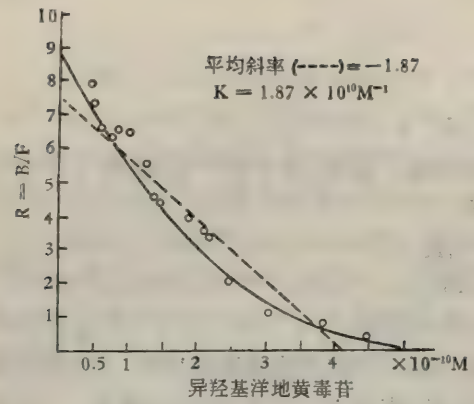


图 3　异羟基洋地黄毒苷（Digoxin）抗血清之平均亲合力常数K的测定(图解法)。$K=1.87\times10^{10}$升/克分子。

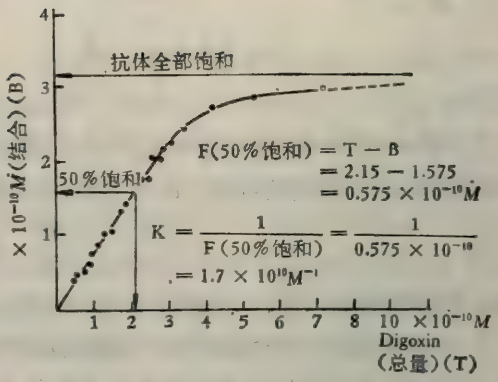


图 4　异羟洋地黄毒苷抗血清之平均亲合力常数K估测之饱和曲线。

射免疫的最适条件，需要测定抗血清的平均亲合力常数。在第五章已介绍过的 K 值的精确测定方法，或者手续过于繁复，或者对某些系统不适用。这里介绍两种简便的方法，也能估计出足够精确的 K 值。

（1）图解法(Scatchard plot)（Berson & Yalow, 1959）

在一定稀释浓度的抗血清内，加入逐渐增多的抗原，使抗体饱和。以 B/F 值对结合抗原量 B 作图(图 3)。如抗体所有结合位点的亲合力是均一的，则应得到一直线，其斜率等于$-K$。然而，由于抗体亲合力的不均一性，实际上常呈一曲线。此方法的另一优点，还可以根据直线在横轴上的截距，估计抗体结合部位的浓度。

（2）饱和法（Saturation method)（Odell 等，1969）

此方法的原理是仿照酶反应的 Michaelis 常数测定法。 对于一定的酶反应系统：

$$E+S \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} E\cdot S \underset{K_4}{\overset{K_3}{\rightleftharpoons}} P+E$$

按定义，Michaelis 常数

$$K_m=\frac{K_2+K_3}{K_1},$$

可用酶（E）被底物（S）50% 饱和时之底物浓度的倒数来表示。

在抗原抗体反应系统中，$K_3=0$。因此，对于供放射免疫测定的抗血清的饱和曲线，

表 3　一些放射免疫抗血清的平均亲合力常数

抗　血　清	K_a
抗-HTSH	3×10^{7}
抗-HCG	1.2×10^{9}
抗-E_2	2.8×10^{9}
抗-P	2.9×10^{9}
抗-胰岛素	$\sim1.0\times10^{9}$

（据 W.D Odell 1971）。

当 50% 饱和时，游离抗原的浓度的倒数，就等于该系统的平均亲合力常数 K（图 4）。从以上两图可看出，两种方法得到的异羟基洋地黄毒苷抗血清的平均亲合力常数是相近的。用这些方法测定的一些放射免疫抗血清之平均 K_a 值见表。

4. 抗血清的制备和选择

放射免疫的抗血清要求有适当的效价、很高的专一性和亲合力。由于灵敏度的限制因素是抗体的亲合力常数 *K* 值的大小，供放射免疫用的抗血清的制备中，首先应注意提高专一抗体的亲合力。然而，实际工作中遇到的困难是，即使用同一个纯化的抗原，相同的免疫程序进行免疫，不同的个体之间抗体的亲合力也有很大的差异，并且同一个体免疫过程中，随注射抗原次数和免疫时间长短不同，*K* 值也有变化。因此，目前最好的办法仍然是多免疫一些动物，从其中选择最适用的抗血清。

通常采用的方法是，免疫过程中每次放血得到的样品，作一系列稀释，加微量的标记抗原（Ag*）保温，通过测定得到一系列的剂量反应曲线（图5）。这些资料对于推测得到最高效价的抗血清所需的注射次数和总抗原剂量是有参考价值的。同时也可用于最后作放射免疫测定时，选择抗血清最适稀释度的参考。通常选择 $B/F=1$（即 50% Ag* 被结合）时的稀释度*。在这一条件下，测定的灵敏度和精密度可达最适比例。今举抗人 FSH血清为例，说明抗血清的制备和选择的一些经验（Odell 和 Hescox，1971）。

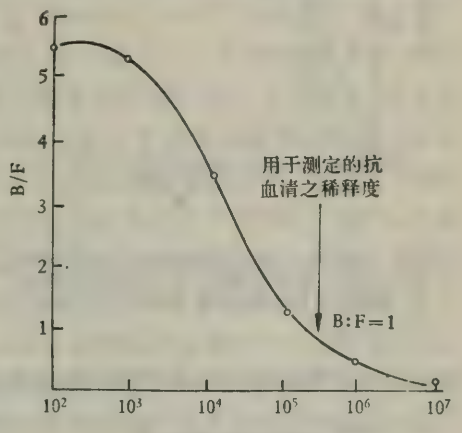


图 5 剂量反应曲线。用抗血清稀释度的倒数对结合的标记抗原与未标记抗原之比值（*B*/*F*）作图表示（据 Odell，1971）。

用人类促滤泡生长素（HFSH）对新西兰品系的家兔进行免疫。免疫程序是用 5.0 国际单位（I.U.）的 HFSH，溶于 1 毫升生理盐水，加等体积的 Freund 完全佐剂制成乳液，分两处皮下注射。如图 6 箭头所示，每隔 10 天加强注射一次。免疫第五周后放血，并测定抗血清对 0.1ng ^{131}I-FSH 产生 50% 结合所需的稀释度。以稀释倍数的倒数对免疫的周数作图（图 6）。从这一类实验可看出免疫原的剂量、注射频率与抗血清效价之间有几点值得注意的关系：

1）抗原的总剂量。抗血清的效价在免疫过程中随累积的抗原剂量增加而逐渐升高，达到一坪值后（127I.U. 时，效价为 10^5），当抗原剂量继续增加时，抗血清的效价也不再升高（图 7）；

2）注射频率。两次免疫注射的间隔时间超过 10—14 天，抗体效价增高的速度就降低（图 8）。以上是就抗血清的效价而论，然而抗血清的品质更应当注意的是有特别高的亲合力（*K* 值）。

根据抗体形成的选择理论，抗原分子进入体内后便和淋巴球表面的抗原受体选择地

---

* 有的测定系统选择 $B/F=0.5—1$，亦可得到好的测定结果。

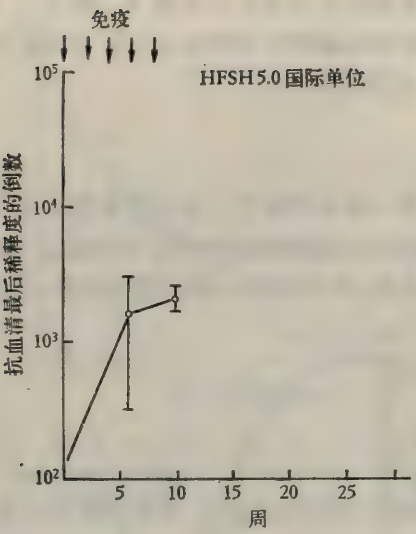


图 6　家兔对人 FSH 免疫(每次 5.0 I.u.)的反应过程。每点代表取自 6 只动物的平均值。横线内为标准误差(据 Odell, 1971)。

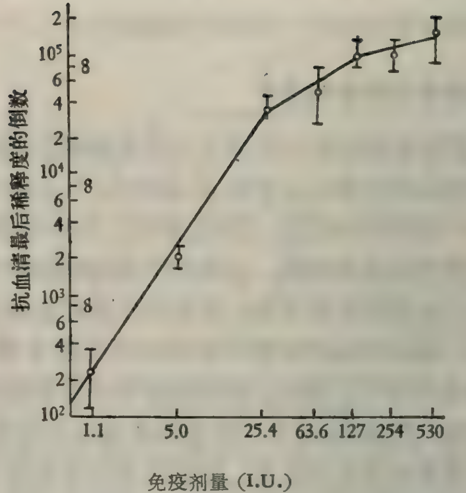


图7　HFSH 免疫剂量(加 Freund 完全佐剂,每隔 10—14 天注射一次)和 5 次注射后得到的效价之间的关系。注射剂量超过 127I.u. 后效价不再升高(据 Odell 和 Hescox, 1971)。

结合，一些受体和抗原决定簇的适合性高（亲合力高），另一些适合性差（亲合力低)。由于受体的适合性主要是随机分布的，高亲合力受体的数量总比低亲合力的受体少。若假定其他因素不变，能和一定抗原决定簇 D 有不同程度地结合的受体的数量依赖于 D 的浓度，因而也就依赖于抗原的总剂量。因此，大量抗原趋向于产生平均亲合力低的大量抗体（效价高);而低剂量趋向于产生平均亲合力高的小量抗体(效价低)。其次，免疫过程中，随免疫时间的延长趋向于逐渐产生亲合力愈来愈高的抗体，并且两次免疫间隔时间愈长，最后产生的抗体的亲合力愈高。这可能是由于免疫过程中，有高亲合力受体的B-淋巴球逐渐被选择的结果 (Mitchison, 1972)。抗体亲合力随免疫时程而逐渐增加，也受到抗原剂量的影响。对于产生最大亲合力抗体的过程存在一个最适的剂量，超过最适剂量，抗体亲合力开头增加快，随即就缓慢下来，维持在一个较低的水平。如用DNP-BGG 免疫家兔时，最适剂量为 0.5 毫克，>0.5 毫克反而亲合力降低 (Siskind, 1970)。

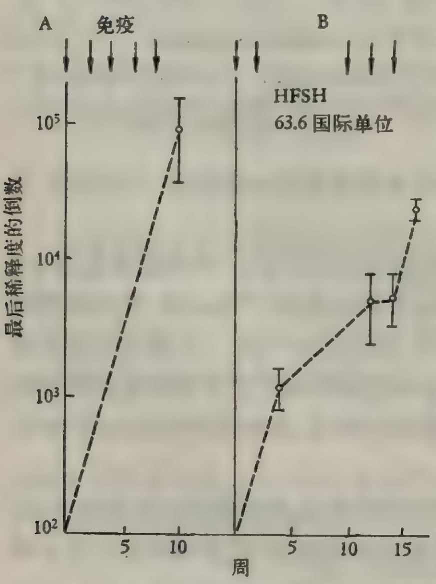


图 8　3 组家兔用 63.6 国际单位人 FSH 免疫的反应。一组每隔 10 天免疫一次 (A)。其余两组先相隔 10 天注射 2 次，8 周后再每隔 10 天进行第 3、第 4、和第 5 次注射(B)。注意 (A) 组比 (B) 组的效价高(据 Odell 和 Hescox, 1971)

如前述，血浆内激素，特别是多肽激素的含量极微，浓度在 $1-100\times10^{-12}M$ 水平(表 1)。因此，放射免疫抗血清要求要有极高的亲合力(对于循环中含量较大的激素，如HCG,

氢皮质酮，甲状腺素等，亲合力的要求相应地要低一些）。 Mitchison (1972) 根据以上的考虑，建议在多肽激素放射免疫的抗血清制备中，如免疫家兔，最好用 0.1—5.0 毫克 激素的较粗制品，加 Freund 完全佐剂作初级免疫，此后注射量还要减半。 初级免疫过程中，抗体水平缓慢升高，6 周时达到高峰。加强注射和第一次注射应相距较长时间，不应短于四周，此后也不应相距太长，超过每一个月一次。每次加强注射后 10 天左右，抗体水平达到最大值，因此动物应在第 7—14 天放血，并作剂量反应曲线测定，检查抗血清品质，以供选择。 Hurn 和 London (1970) 用实验证明，初级免疫和加强注射之间保持一段较长的休息时间有利于提高抗血清的亲合力，并且还证明这种亲合力高的抗血清，效价相当低。这是和前述抗体产生的选择理论，和 Odell 及 Hescox (1971) 实验相一致的。从以上的讨论可见，抗血清产生中，影响效价（抗体的数量）和亲合力（K 值）的因素似乎是矛盾的。放射免疫测定中，抗血清的亲合力是决定灵敏度的关键因素。不过效价（最适稀释度）和测定的精密度也有一定关系。因此，一个好的供放射免疫的抗血清首先应具备足够高的平均亲合力（K 值）（适合于欲测激素血清中浓度，浓度愈低要求 K 值愈高），同时也应有适当的效价，使测定的灵敏度和精密度达到最适的配合。为了达到这一要求，目前最可靠的办法仍然是根据上述的理论原则，多免疫一些动物，从中挑选最适合的抗血清。不过也积累了一些可供参考的经验。产生抗体的动物最好用非纯系动物，以免遇到对一定抗原反应能力低的纯系。对于人类多肽激素，一般说来豚鼠比家兔能产生更好的抗体。其次，较粗的激素制品和高度纯化的制品作免疫原都能得到成功，有时粗制品反而能产生亲合力更高的抗体。关于注射途径，过去一般是用抗原乳液皮下或肌肉内注射。近来，为了节省稀少的抗原，有人改用淋巴结内注射（腘淋巴结），有时也能得到满意的结果 (Boyd 和 Peart, 1968)。 更易掌握的方法是多点皮内注射，在遍及全身相当大的面积上，分许多点（多于 40 点）作皮内注射 (Vaitukaitis 等, 1971)。 经过这样一次注射后，抗体产生迅速达到高峰，无需再作第二次加强注射。因此，这一方法被认为是能在较短时间内迅速产生抗体，并节省抗原的好方法。

总之，为了制备亲合力最高的供放射免疫用的抗血清，应掌握的要点是免疫原的量应减少到最低有效剂量（一般说来，100 微克纯免疫原就足够了，粗制品可酌量增加），而两次注射间隔时间尽可能延长。最好的办法是低剂量多点注射 (Hurn, 1974)。

（三） 应　　用

放射免疫测定，由于有很高的灵敏度和专一性，在内分泌学和生殖生理学研究中得到广泛的应用。近年来，在国外随着测定方法的自动化和成套试剂的供应，为临床上的应用更加提供了方便。在设备完善的化验室一个技术员每周能够测定几千个样品。 在国内，HCG 和肿瘤相关抗原（甲胎蛋白）等的放射免疫测定也开始应用。目前已证明有临床应用价值的放射免疫测定法列于表 4。 现将其中几类择要叙述如下：

1. 垂体和胎盘糖蛋白质激素

这一类的糖蛋白激素在加 Freund 完全佐剂时有足够强的免疫原性。抗血清的制备，以人类 HFSH 作代表，在前一节已叙述过了。虽然在制备抗血清时可以用较粗的激

表 4 有临床应用价值的放射免疫测定方法

多肽和蛋白质激素	
垂体前叶	黄体化激素（LH）；促滤泡生长激素（FSH）；促甲状腺激素（TSH）；人生长素（HGH）；催乳素；促肾上腺皮质激素（ACTH）
垂体后叶	精氨酸一加压素（AVP）
副甲状腺	副甲状腺激素（PTH）
胰	胰岛素
胎盘	人胎盘催乳素（HPL）；人绒毛膜促性腺激素（HCG）
其他	血管紧张素 I 和 II；血管紧张素原酶（renin）；促胃液素(gastrin)
其他多肽和蛋白质	
血浆蛋白	IgE；纤维蛋白原；其他血凝因子
微生物抗原	肝炎相关抗原（HAA）
肿瘤抗原	α-甲胎蛋白（α-FG）；癌胚胎抗原（CEA）
半抗原激素	
甲状腺	甲状腺素（T_4）；三碘甲腺氨酸（T_3）
肾上腺	皮质醇；去氧皮质酮；醛甾酮
生殖腺	睾酮；孕酮；各种雌激素
前列腺素	$PGF_{2\alpha}$，PGE_1
其他半抗原	
药物	异羟基洋地黄毒苷；吗啡；二苯基海因
其他	叶酸；环状 AMP；维生素 B_{12}，D

素制品作为免疫原，但是在放射免疫测定系统中，用于同位素标记的标准抗原则要求是高度纯化的抗原（至少 90% 以上的纯度）。对于像人类垂体激素（如 HFSH）这样稀少的材料，很难得到足够量的高度纯化的抗原。为了节省材料起见，也有人采用先标记部分纯化的抗原（HFSH），然后再用此标记物进行最后几步的纯化（Franchimont，1966）。有一些蛋白质激素抗原虽然在化学性质上不均一，而在抗原性上是均一的。例如人类生长激素（HGH）在提取过程中易于脱氨基而产生理化性质略有不同的分子，而抗原性却无改变。此时，也不妨直接用这种免疫学上纯的抗原作为标记抗原（Berson and Yalow，1966）。

建立垂体糖蛋白激素（LH，FSH，TSH）放射免疫测定的主要困难，除了不易得到足够量的纯化抗原以外，还在于这些激素之间，以及和胎盘绒毛膜促性腺激素（HCG）之间由于结构上的相似而存在着免疫学上的交叉反应。近来关于这些激素亚基结构的知识方面取得的进展，为放射免疫方法学上的改进提供了理论基础（参看第一章 60 页）。

LH，FSH，TSH 和 HCG 都是由 α，β 两个含醣的亚基组成的。所有这些激素的 α-亚基的化学结构和抗原性都很相似，这可能是它们之间在免疫学上交叉反应的主要原因。各种激素的 β-亚基则彼此不同，各具有生物学上和免疫学上的专一性。用不同的 β-亚基免疫时，可以得到不同的专一的抗血清（Pierce，1971；Amir，1972；Rabinowitz 等，1973）。因此，可以利用各种激素的 β-亚基作免疫原，建立更为专一的测定法。

由于比较纯的 HCG 较易制备，同时不含有垂体糖蛋白，LH 的放射免疫测定过去是利用 LH 和抗 HCG 血清之间的交叉反应（Midgley，1966；Saxena 等，1968）。这

种方法自然无法区分血清中的 LH 和 HCG。近年来，用 LH-β 亚基制备的抗血清能够区分 LH 和 HCG（这两种激素的抑制曲线的斜率的差别在统计学上是有意义的）。这种抗血清经适当吸收后，在有 HCG 存在的条件下，可用于血清中 LH 的测定（Vaitukaitis 等，1972b）。另一方面，HCG-β 亚基的专一抗血清能在有生理量的 LH 存在条件下，区别地测定 HCG，并且灵敏度也有显著提高（Ross 等，1972a）。因此，这种改进了的方法可以应用到滋养层细胞疾病治疗过程中血清 HCG 微量变化的测定（Braunstein 等，1973；Tashjian 等，1973）。

人类 FSH 比 LH 更难得到足够量的纯化抗原，并且和 HCG，LH，TSH 有交叉反应。专一的抗 HFSH 血清的制备是相当困难的。如前一节所述，通常是采用 HFSH 免疫家兔，得到的抗血清再经过 HCG 吸收的方法（Odell 和 Hescox，1972）。直到最近才有人用少量高度纯化的 HFSH，利用"低剂量多点注射法"得到无需吸收的专一的抗 HFSH 血清（Butt，1974）。为了减少不易得到纯化 HFSH 的困难和提高专一性，有人建立了"异种测定系统"（Midgley，1971；Hendrick 等，1971），即用一物种的激素（如羊 FSH）的抗血清来测定另一物种的同一种激素（如人 FSH），结果测定专一性有所提高。如像原来的羊 FSH 标记抗原和抗羊 FSH 血清测定系统，与羊 LH 和 TSH 都有相当程度的交叉反应，以致不能作为有效的测定方法。然而，经改为用 HFSH 标记抗原和抗羊 FSH 血清的"异种测定系统"，就能得到对羊、大鼠和人的 FSH 的专一的测定结果。同理，也建立了 LH（Niswender 等，1968）和 TSH（Franchimont，1972）的"异源测定系统"。这种专一性的提高可以用已知的激素亚基结构的知识来解释。在 FSH-β 亚基放射免疫测定中，羊、大鼠、牛的 FSH-β 亚基和人类 HFSH-β 亚基之间全部有交叉反应，而在人类 α-亚基放射免疫测定系统中，这些物种的 α-亚基和人的 α-亚基之间完全没有交叉反应。换句话说，同一物种内各激素之间的交叉反应是由 α-亚基决定的，而不同物种间同一激素的交叉反应却是由 β-亚基决定的。"异种测定系统"显然是通过同一激素之 β-亚基的种间交叉反应起作用的，而种内的几种激素间的交叉反应则不能起作用，因而自然地加强了抗血清对该激素测定的专一性。

近年来对于这些糖蛋白激素分子的多糖部分的研究得到的知识，也有助于解释这些激素的免疫学活性和生物学活性之间的复杂关系。HCG，FSH，LH 用不同方法提取过程中，激素分子上的唾酸可能有不同程度的丧失。激素分子上唾酸含量和激素在血流内持续时间有密切的关系，这种含量的变化自然会影响生物测定的结果。另一方面，唾酸含量的变化对放射免疫测定并无影响。这样就造成了两种测定方法得到的结果之间的差异。由于这一原因，放射免疫测定结果不应当用生物活性单位表示，而最好用一定标准样品的重量单位来表示。

尿内排泄的糖蛋白激素的测定是一个较复杂的问题。虽然由于妊娠和滋养层细胞疾病时尿内 HCG 排出量很大，通常未经处理的尿就可进行 HCG 的放射免疫测定，可是对于 FSH 和 LH 用未经处理的尿作测定就不可靠了（Ryan，1969）。尿内 HCG，LH，FSH 的放射免疫测定结果比生物测定的结果偏高。尿内游离亚基的存在，各种处理尿液的方法不同程度地去除了亚基和唾酸，都可能是造成这种差别的原因（Stevens，1969；Franchimont，1969）。此外，用尿内 FSH 作免疫原制备的未经吸收的抗血清，和用垂体 FSH 作免疫原制备的抗血清的免疫反应性也有不同，这也可能是一个影响因

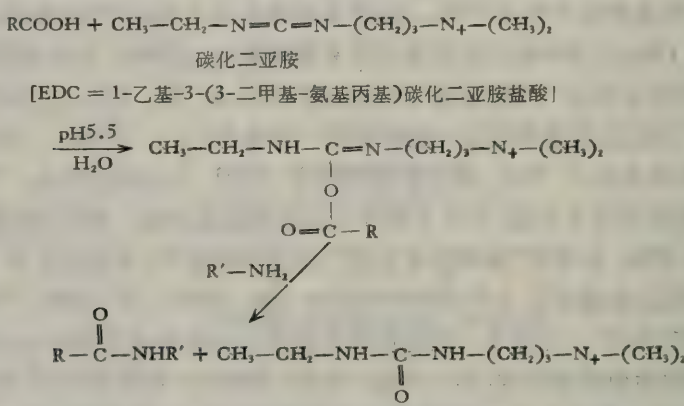
素（Olivieri 等，1974)。

2. 多肽激素

由于分子量太小，多肽激素即使有佐剂时，也只表现弱的或者没有免疫原性。为了制备适合放射免疫测定的抗血清，需要把多肽激素当作一个半抗原，和载体蛋白质（如牛血清白蛋白）结合。这样得到的抗血清，经过载体蛋白质吸收后，就可以得到对半抗原——多肽专一的抗血清。常用的结合剂和反应方式如下：

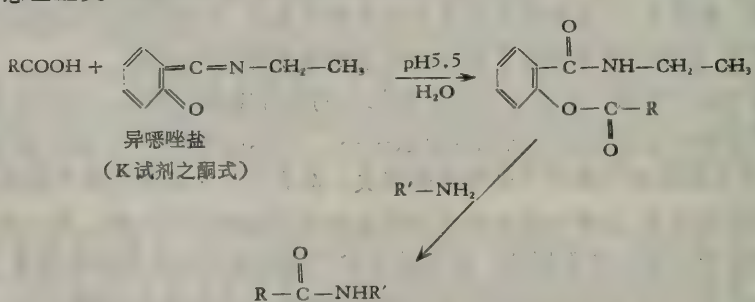
(1) 活化蛋白质或多肽的游离羧基形成肽键的结合剂

1) 碳化二亚胺类（Carbodiimides）

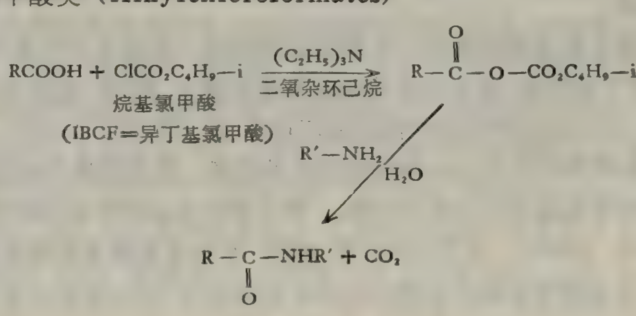


其中，RCOOH 和 R′-NH_2 代表多肽或载体蛋白质。通过碳化二亚胺对 RCOOH 羧基的活化，而与 R′-NH_2 的氨基缩合，形成肽键。

2) 异噁唑盐类（Isoxazolium salts）

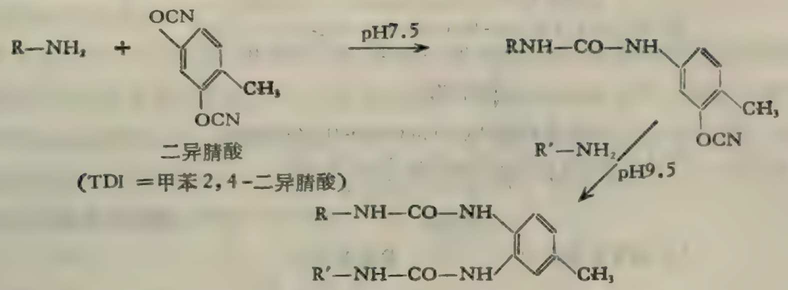


3) 烷基氯甲酸类（Alkylchloroformates）

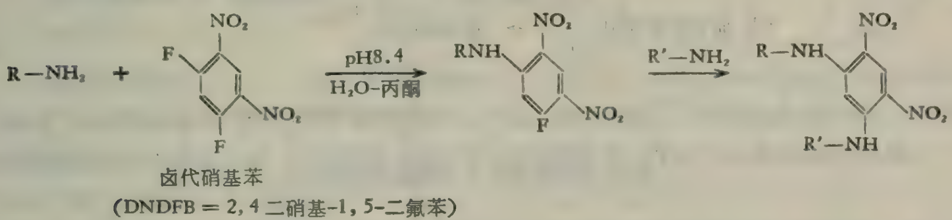


(2) 联接氨基的结合剂

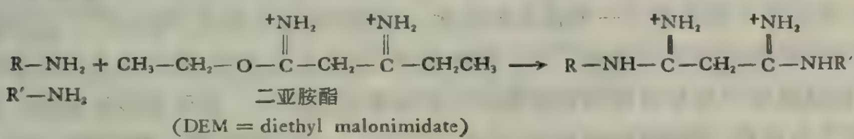
a. 二异腈酸类 (Diisocyanates)



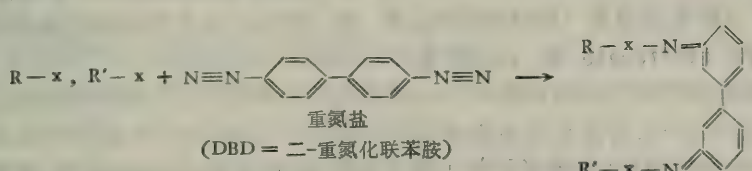
b. 卤代硝基苯 (Halonitrobenzene)



c. 二亚胺酯 (Diimidoester)



(3) 重氮盐类 (Diazonium Salts)



其中 x = His., Tyr., Lys.

以上这些连接方法原则上也适用于其他半抗原(如甾体、前列腺素、核苷酸等)。不过应当注意,多肽或其他半抗原连接到蛋白质上的方式不同,可能对抗体的专一性产生不同影响。例如血管紧张素-II、(一个 8 肽, N 端有一个游离的氨基, C 端有一个游离的羧基),若用碳化二亚胺法时,结果将以分子的任一端或两端同时和载体蛋白质连接。血管紧张素-II 的这三种结合形式将产生不同的抗体。以 C 端和载体蛋白质相连的血管紧张素-II 将产生专一性针对 N 端的抗体。这些抗体将会与血管紧张素-I 发生广泛的交叉反应,因为这两种激素的唯一区别在于血管紧张素-I 在 C 端 9,10 位置多两个氨基酸残基。如果测定的目的是血管紧张素-II, 并要求避免血管紧张素-I 的干扰, 这种连接方式显然就不适用了。如果改用一种连接氨基的结合剂,特别是对氨基有高度专一性的双功能基的二亚胺酯,就可以避免这种困难,而得到满意的结果(图 9)。

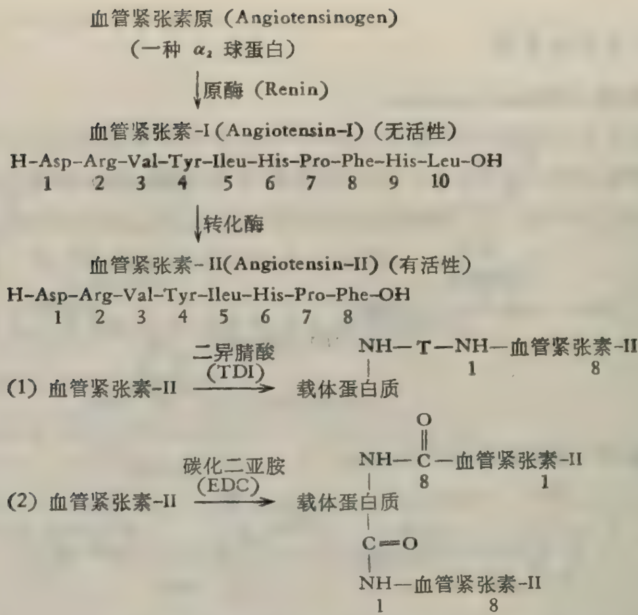


图 9 血管紧张素-II 和蛋白质连接方式。

许多情形下，半抗原不能直接和载体蛋白质连接，或者由于这些半抗原没有能结合的功能基，或者为了要得到专一性最高的抗体，必须保留这些基团不被取代。这时就需要合成这些半抗原的适当的衍生物。对于甾体激素，这点尤其重要，我们将在下面讲到。

目前已经能用放射免疫测定法测定的多肽激素主要有：肠胃道多肽激素，包括促胃液素、胰升血糖素、促胰腺分泌素等(参看 Bloom, 1974 的综述)；垂体后叶多肽激素，包括加血压素、催产素和 Neurophysin 等(参看 Chard 和 Martin, 1974 的综述)；垂体前叶的促肾上腺皮质激素 (Matsukura, S. 等, 1971)；以及下丘脑的黄体化激素释放因子 (LH-RF) (Jeffcoate 等, 1974) 等。

3. 甾体

体液中的甾体激素(性激素和肾上腺皮质激素)种类繁多，含量极微，需要很灵敏和很专一的方法才能有效地测定。 Erlanger 等 (1957) 曾初步建立了制备抗甾体血清的基本方法，但专一性不够强，还不适用于甾体激素的放射免疫测定。60 年代初期，Murphy 等 (1963) 利用一些天然蛋白质(血浆和靶组织蛋白质)和某些甾体专一结合的特性，建立了甾体激素的蛋白竞争结合测定法。这才使得有可能对小量体液和小动物上进行甾体激素的超微量分析。近年来，抗甾体血清的制备方法有了很大的改进，在专一性和亲合力方面都超过了蛋白竞争结合法。因此，目前甾体超微量分析的研究重点又转到放射免疫法方面来了。

甾体激素的抗血清的制备方法大体上分以下几步：

(1) 甾体-蛋白质结合物的合成

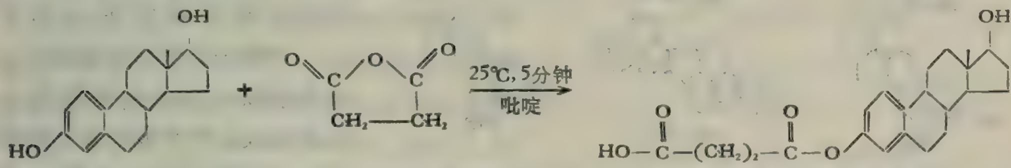
基本方法仍然是按照 Erlanger 等 (1957) 加以改进。由于甾体激素的羟基和酮基

不能直接和载体蛋白质形成有效的共价键，因此需要制备甾体的衍生物(含有游离的羧基)，然后与人，兔或牛血清白蛋白上赖氨酸的 ε-氨基缩合。

1) 甾体衍生物的制备

(i) 琥珀酸衍生物

甾体分子如只含一个羟基(如雌酮，睾酮等)，琥珀酸化可直接将甾体和琥珀酸酐加入到吡啶内，室温下保持 3 天，反应就可完成。含有两个羟基的甾体分子，如雌二醇-17β(E_2)，可利用 3 位的羟基(酚)和 17 位的羟基(仲醇)的反应能力不同(酚基较活泼)，而选择地酯化一定位置的羟基。 当在 25°C 条件下，E_2 和琥珀酸酐在吡啶内反应 5 分钟，则 3 位的酚羟基被选择地酯化：

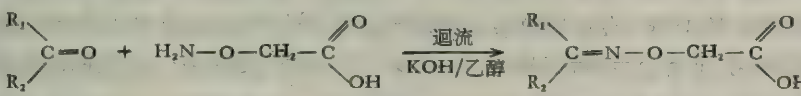


1 毫克分子 E_2　　3 毫克分子琥珀酸酐　　3-雌二醇单琥珀酸(产量 55—80%)

如果上述反应继续进行三天，则可得 3,17-E_2 双琥珀酸。 再将此双琥珀酸衍生物在甲醇(碳酸钠)内选择地使 3 位的酯键水解，就可以得到 E_2 的 17-单琥珀酸衍生物。

(ii) 肟 (oxime) 衍生物

利用 (O-羧甲基) 羟胺和甾体的酮基反应可以制备睾酮，醛甾酮等的肟衍生物 (Furuyama 等，1970)。 反应如下式：



甾体酮基(O-羧甲基)羟胺　　甾体之(O-羧甲基)肟

此外，近来还有人制备甾体的硫解衍生物 (Thiol derivatives) 也得到成功 (Lindner 等，1972)。

2) 甾体衍生物和蛋白质的结合反应及结合位置

甾体衍生物的游离羧基，可经碳化二亚胺缩合反应而与白蛋白所含赖氨酸的 ε-氨基形成肽键。此反应过程中，蛋白质分子内或分子间常发生交叉结合，产生干扰。因此，常改用混合酸酐反应 (Mixed anhydride reaction) (Erlanger 等，1957)。 每一克分子载体白蛋白上结合的甾体的克分子数很少超过 30。 甾体分子的结合数目似乎和抗血清的效价、亲合力或专一性没有什么关系。

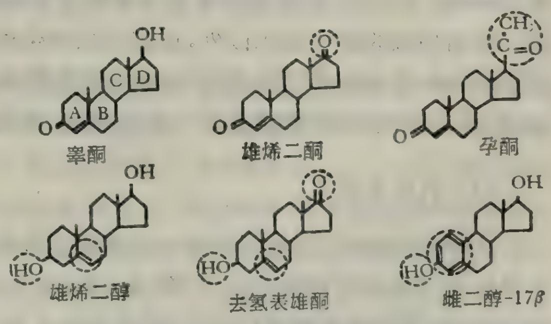


图 10　四种雄激素、睾酮和雌二醇-17β 之构造式，虚线圈内表示和睾酮的分子构造不同的部分 (据 Niswender 和 Midgley, 1971)。

许多甾体激素的功能基位于分子 A 环的 3 位和 D 环的 17 位。初期的研究工作中，甾体是通过这些位置和载体蛋白质结合的。用这样的结合物免疫动物后得到的抗血清，其专一性是针对远离分子结合点一端的构造。 由于各种中性甾体结构的大多数区别在 C环或 D 环上的功能

基(图 10)，因此 17 位结合的睾酮的抗血清的专一性很低，和许多 Δ^1-3-酮甾体发生广泛的交叉反应，不能区分睾酮、表睾酮、雄烯二酮和孕酮 (Jeffcoate,1971)。同理，经 17 位结合的雌二醇的抗血清和其它在 A 环有酚基的雌激素也有广泛的交叉反应，因为它们主要在 17 位存在区别(图 11)。反之，经过 3 位结合的甾体的抗血清，则有相反的性质，能测出 D 环的差异，而和 A 环的差异有关的甾体之间便出现交叉反应。

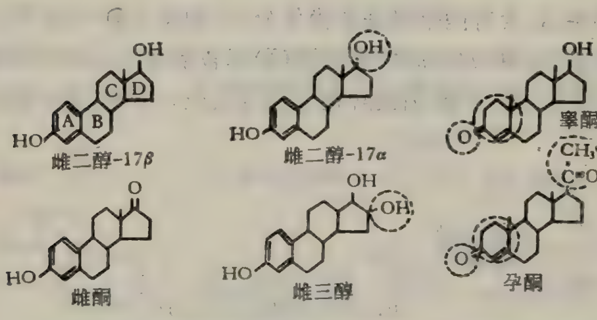


图 11　四种雌激素、睾酮和孕酮之结构式。虚线圈内表示和雌二醇-17β 或雌酮的分子构造的不同部分(据Niswender 和 Midgley, 1971)。

根据上述发现，为了提高抗血清的专一性，甾体半抗原应当避免在分子的 A 环或 D 环的位置，而最好在 B 环或 C 环的位置和载体蛋白质结合。孕酮-11 位结合物的抗血清和孕酮-3 位结合物的抗血清相比较，对孕酮的专一性要高。这可能就是由于在 11 位结合时，留下孕酮分子的两端，保持更多的和抗体结合的专一性结构 (Morgan 和 Cook, 1972; Youssefinejadian 等, 1972)。最成功的例子是雌二醇-6 位结合物，其抗体和雌酮或雌三醇的交叉反应很低(只有 1% 或<1%) (Exley 等, 1971; Jeffcoate 和 Searle, 1972; Kuss 和 Goebel, 1972; Lindner 等, 1972)。可是，雌三醇-6 位结合物的抗血清，和雌二醇的交叉反应却很高 (>20%) (Gross 等, 1971)。这似乎提示，甾体的抗血清对于少一个基团的构造(如对于雌三醇抗血清而言，雌二醇在 16 位少一个羟基)要比多一个基团的构造，更不容易识别。

(2) 抗血清的制备和鉴定

有了适当的甾体-蛋白质结合物之后，按照前述的"低剂量多点注射法" (Hurn, 1974) 得到高效价的抗血清，通常是没有困难的。不过应注意，制备抗甾体血清所需的时程相当长，免疫 9 个月或 9 个月以上，抗血清的效价和亲合力才能达到最大值 (Abraham 和 Grove, 1971)。抗血清的鉴定可用前述的相同方法 (见 343 页) 不过，专一性的检查除了结构相似的那些甾体以外，还应当注意生理浓度的皮质醇和胆固醇(这两种物质的浓度比所测的甾体激素可能高近 1,000 倍)的影响，特别是未经层析纯化的血清样品尤其如此。此外，还要注意体液中非专一因素(如血清蛋白，尿素等)可能的干扰。

(3) 同位素标记

放射免疫测定中，用于和专一抗体结合的标记半抗原通常是用 ^3H 标记的甾体。每一个甾体分子最多能标记上 4 个 ^3H 原子[如 (1, 2, 6, 7-^3H)-雌二醇]。然而，^{125}I 标记比 ^3H 标记具有测试效率高(一个 ^{125}I 原子比 4 个 ^3H 原子的测试效率约高 25 倍)、标记物制备较简便等许多优点。此外，有一些专一性很高的抗血清，甚至能区别 ^3H 标记的和未标记的甾体分子。例如，对于雌二醇-6 位结合物的抗血清，(1, 2, 6, 7-^3H)-雌二醇的结合能力只有未标记的雌二醇的 50% (Edwards 等, 1974)。因此，若用 ^3H 标记物时，测

定的灵敏度和专一性都将大大降低。

用 ^{125}I 标记甾体-蛋白质结合物的研究近来主要是在两方面进行的。一方面是用 ^{125}I 直接标记甾体-蛋白质结合物，^{125}I 仅参入载体蛋白质(雌激素的酚环也可能碘化)。此方法的主要缺点是标记物的可使用期太短。(Jeffcoate, 1971; Jeffcoate 等, 1973)。另一种较好的方法是用 ^{125}I 标记含酪氨酸甲酯或组织胺残基的甾体衍生物 (Midgley 等, 1971; Gilby 等, 1973) (图 12)。碘化反应还可以在这些残基和甾体结合以前就进行，如先用 ^{125}I 标记组织胺，再使此标记物与雌二醇-6-(羧甲基)肟结合 (Nars 和 Hunter, 1973)，这样就可以避免因碘化引起的甾体分子本身的损伤。上述两种标记物比较起来，组织胺又比酪氨酸甲酯要好。酪氨酸标记物较难制备，可使用时间也较短，而组织氨标记物却能保存几个月 (Edwards 等, 1974)。此外，组织胺标记物还有一个优点，它们和甾体连接的空间关系与甾体和载体蛋白质连接的空间关系是相似的；如睾酮-3-^{125}I-组织胺，其中组织胺是通过"肟桥"和睾酮分子的 3 位相连接的。已知一些抗体能够识别甾体-蛋白质结合物之间的"肟桥"。如睾酮-3 位结合物的抗血清不仅能够识别睾酮分子本身，而且还能识别与载体蛋白相连的"肟桥"和白蛋白的赖氨酸残基，对睾酮、睾酮肟衍生物和睾酮-3-肟-赖氨酸的亲合力常数分别为 0.3，1.6 和 5.9×10^9 升/克分子 (Gilby 和 Jeffcoate, 1973)。因此，如用睾酮-3-^{125}I-组织胺作标记物时，它和专一的抗血清(睾酮-3-白蛋白接合物的抗血清)的亲合力要比 ^3H-睾酮高。

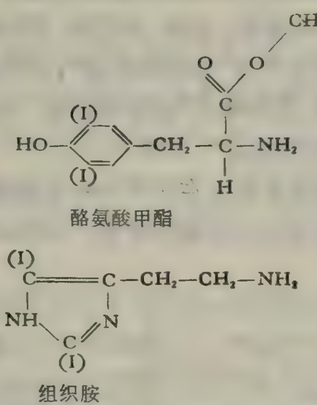


图 12 酪氨酸衍生物和组织胺的碘标记物，其中 (I) = ^{125}I (据 James 和 Jeffcoate, 1974)。

(4) 结合和游离半抗原的分离

除活性碳吸附法外，常采用固相法 (Abraham 和 Odell, 1970)，硫酸铵沉淀法和双抗体法。

(5) 生物样品的纯化

甾体激素在生物样品中的含量极微，一般需要经过初步纯化后才能测定。常用的方法有溶剂分配法，凝胶过滤 (Sephadex LH-20) 和层析法。后者使用最广，包括薄板层析，柱层析(硅胶、氧化铝和 Celite)。Celite 微量柱层析 (Abraham 等, 1972) 和 Sephadex LH-20 凝胶过滤 (Murphy 等, 1971) 的效果最好，可分离许多种极性不同的甾体。

目前甾体激素的放射免疫测定已经在内分泌学和生殖生理学等方面广泛采用。除天然的甾体激素外，还开始用于合成的甾体避孕药物，如甲孕酮的测定 (Cornette, J. C. 等, 1971)，正在成为计划生育基础研究所不可缺少的技术。最好的抗血清的测定极限可低达 1—2 微微克/毫升。这方面的文献可参考下列 Diczfalusy, 1970; Peron 和 Caldwell, 1970; Odell 和 Daughaday, 1971; James 和 Jeffcoate, 1974 的专著和综述。

4. 肿瘤相关抗原

目前已经证明，肿瘤能分泌一定的多肽抗原（包括激素、酶和其他抗原）到体液中，并且这些抗原和肿瘤之间存在一定的相关性，因而称为肿瘤相关抗原。这些抗原按其和该肿瘤的组织来源是否相合，又可分为“相合性”抗原（如副甲状腺瘤产生副甲状腺素，绒毛膜上皮癌产生 HCG，如此等等）和“外位性”抗原（如支气管癌能产生正常支气管组织所不能产生的激素，包括 ACTH，FSH，TSH 和 GH，绒癌产生 TSH，如此等等）。另外一些肿瘤能产生“癌胚性抗原”，这些抗原在胎儿期存在，正常成体组织内消失，而在癌变后又出现，因此称为“癌胚性抗原”，如原发性肝癌产生的甲种胎儿球蛋白（α-FP）和直肠癌的“癌胚性抗原”（CEA）。

肿瘤相关抗原在体液中的含量极微，用放射免疫法定量地测定这些抗原，有助于肿瘤的诊断和对治疗过程的掌握。HCG 的测定在绒毛膜上皮癌（简称绒癌）上的应用是比较成功的例子。HCG 放射免疫测定所能确诊的最小的绒癌的大小约为 1—5 毫米^3（约 10^6—10^7 细胞），这比其他诊断方法优越。每一个癌细胞每天产生 10^{-5} I. U. HCG。绒癌 HCG 分泌量和癌细胞总数成正比，治疗过程中连续测定 HCG 浓度就可以反映癌细胞群生长或退化的动态（图 13）。比较脑脊液和周沿血中，HCG 浓度的比值，还可以确定有无脑转移以及在治疗过程中的变化（Bagshawe，1969；1974）。

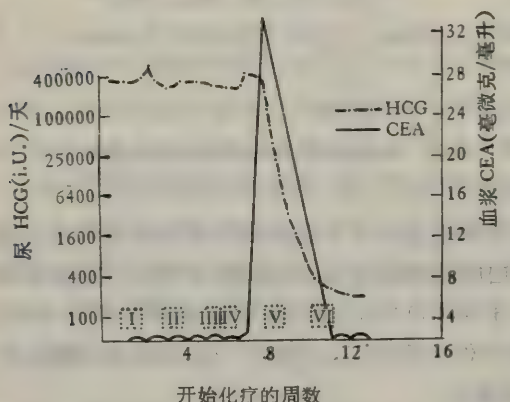


图 13 绒癌化疗过程中 HCG 排泄量和血浆内 CEA 量的变化。前两疗程中无显著变化。第 3，4 疗程后，CEA 急剧升高，然后 CEA 和 HCG 都降低，同时肿瘤体积相应地缩小（据 Bagshawe，1974）。

“癌胚性抗原”放射免疫测定用于肿瘤诊断是 Gold 实验室创始的，他们将血清的过氯酸提取物，用硫酸铵共沉淀法测定，发现 97% 的直肠和结肠癌病人的血清中，CEA 含量均比正常成人血清有显著的升高（Thomson 等，1969）。后经改用双抗体法，血清不需提取就可直接测定，（Egan 等，1972）。最近，测定灵敏度又有提高，达到 1—2 微微克 CEA/毫升（Searle 等，1974）。

另一种“癌胚性抗原”α-FP 也可以用于肿瘤的诊断。用放射免疫法测定正常成人血清中，α-FP 的浓度极低（2—16 微微克/毫升）（Rouslahti 和 Seppälä，1971）。正常妊娠过程中，从第 7 个月开始升高（Brock 和 Sutcliffe，1972）。葡萄胎和绒癌病人，血清中含量低，这也提供了区分这些肿瘤和正常妊娠的一个方法（Seppälä 等，1972）。肝炎急性期（HBAg 阳性）、儿童肝硬化和肝再生期，血清中 α-FP 均有暂时升高。原发性肝细胞癌病人，随着肿瘤生长，血清 α-FP 逐渐增加，有时可高达 4000 微克/毫升。肿瘤切除后就降低。可是，畸态瘤、睾丸瘤、胃癌的肝转移，胆囊癌、前列腺癌和支气管癌等肿瘤患者，α-FP 也可能呈阳性。虽然 α-FP 不是某一类肿瘤独特的抗原，但对于原发性肝癌的诊断仍有肯定的价值。国内应用 α-FP 放射免疫测定于原发性肝细胞癌的诊断，提高了阳性检出率，对临床确定诊断有一定的帮助（上海实验生物研究所

等，1973）。

5. 病毒

病毒在体液中可能以游离的或和抗体结合的形式存在，病毒表面的抗原决定簇又很复杂，还可能吸附寄主抗原参与病毒外壳的组成。这些情况增加了病毒抗原纯化的困难。直到近两三年，由于肝炎抗原检测需要的推动，才开始应用放射免疫法到病毒抗原和抗体的检测。

Walsh 等（1970）最先应用层析电泳分离游离抗原和结合抗原的方法测定血清中的乙型肝炎抗原(HBAg)，但所需时间太长(2—3 天以上)，不能满足血库普查的需要。后来，有人改用双抗体法，测定时间缩短到 18 小时（Aach 等，1971；Coller 等，1971）。固相法（Hollinger 等，1971），和标记抗体的固相"夹心法"（"Sandwich" technique）（Ling 和 Overby 1972）的采用，操作手续更加简化，适用于大规模普查。这些方法略加改变，也适用于抗体的测定。

最后，还要提到放射免疫测定近来的一个发展趋向是对小分子半抗原的测定。对于各种小分子药物，如麻醉剂（吗啡，巴比吐酸）、心脏糖苷（洋地黄毒苷、异羟基洋地黄毒苷），重要的生物活性物质，如前列腺素、维生素（D_3，B_{12}），以及环式核苷酸等应用愈来愈广泛(参看 Marks 等，1974)。另一方面，方法学本身，如半抗原专一抗血清制备方法的改进，分析方法的简化和自动化，使能适应临床化验室的需要，也是正在解决的问题。正如过去蛋白质、多肽激素的放射免疫测定曾经推动了内分泌学的迅速发展一样，对各种小分子半抗原的放射免疫测定的广泛应用，也必将促进药物学，特别是药物对细胞作用机制研究的进展。总之，放射免疫测定是研究内分泌学、生殖生理学、微生物学、药物学等学科和解决计划生育、肿瘤等任务的重要的超微量分析工具，是值得大力发展和应用的一种新技术。

参 考 资 料

专著和综述

Berson S. A. and Yalow. R. S. (1973). In: ''Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology''. Vol. 2A, Part I, p. 84. North-Ho'land, Amsterdam & London.

Kirkham, K. E. and Hunter, W. M., ed. (1971). Radioimmunoassay Methods. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Odell, W. D. and Daughday, W. H., ed. (1971). Principes of Competitive Protein-Binding Assays. Chapters, I, II, III, VI. Lippincott, Philadelphia. Pa.

Peron, F. G. and Caldwell, B. R., ed (1970). Immunologic Methods in Steroid Determination.

Radioimmunoassay and Saturation Analysis. *Brit. Med. Bull.* 30(1), 1974.

Skelley, D. S., et al. (1973). Radioimmunoassay. *Clin. Chemistry* 19, 146.

论文

Aach IR. D. et al. (1971). *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) 68, 1056.

Abraham, G. E. and Grover, P. K. (1971). In, ''Principles of Competitive Protein-Binding Assays''

Amir, S. M. (1972). *Acta Endocrinol.* (Copenhagen) 70, 21.

Bagshawe K. D. (1969). Choriocarcinoma: the clinical biology of the trophoblast and its tumours. Edward Arnold, London.

Bagshawe, K. D. (1974). *Brit. Med. Bull.* 30, 68.

Berson, S. A. and Yalow, R. S. (1959). *Nature* 184 1648.

Bloom, S. R. (1974). *Brit. Med. Bull.* **30**, 62.
Braunstein, J. D. et al. (1973). *Ann. Int. Med.* **78**, 39.
Brock, D. J. H. and Sutcliffe, R. G. (1972). *Lancet* **2**, 197.
Butt, W. R. (1974). 引自 H. S. Jacobs and N. F. Iawton (1974). *Brit Med. Bull* **30**. **55**.
Cameron, C. H. and Dane, D. S. (1974). *Brit. Med. Bull.* **30**, 90.
Chard, T. and Martin, M. J. (1974). **30**, 74.
Coller, *J. A. et al.* (1971). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **138**, 249.
Edwards, R. et al. (1974). In: "Radioimmunoassay and related procedures in medicine," vol. II.
Egan, M. L. et al. (1972). *Immunochemistry* **9**, 289.
Erlanger, B. R. et al. (1957). *J. B. C.* **228**, 713.
Exley, D. et al. (1971). *Steriods* **18**, 605.
Franchimont, P. (1966). In: Donato, L. et al., ed. "Labelled proteins in tracer studies", pp. 303.
Franchimont, P. (1972). In: "Thyrotrophin releasing hormone" pp. 22.
Furuyama, S. et al. (1970). *Steriods* **16**, 415.
Gilby, E. D. et al. (1973). *J. Endocrinol.* **58**, xx(Abstract).
Gilby, E. D. and Jeffcoate G L. (1973). *J. Endocrinol.* **57**, Xl vii (Abstract).
Gross, S. J. et al. (1971). *Steriods* **18**, 555.
Hendrick, J. C. et al. (1971). *Ann. Endocrinol.* **32**, 241.
Hollinger, F. B. et al. (1971). *J. Immunol.* **107**, 1099.
Hurn, B. A. L. and London J. (1971). In: Kiskham, K. E & Hunter, W. M. ed. "Radioimmunoassay Methods" p. 121.
Hurn, B. A. L. (1974). *Brit. Med. Bull.* **30**, 26.
James, V. H. T. and Jeffcoate S. L. (1974). *Brit. Med. Bull.* **30**, 50.
Jeffcoate, S. L. (1971). In: Kirkham K. E. and Hunter, W. M. ed. "Radiommunoassay methods", pp. 151.
Jeffcoate, S. L. and Searle, J. E. (1972). *Steriods* **19**, 181.
Jeffcoate, S. L. et al. (1973). *Clin. Chem. Acta*, **43**, 343.
Jeffcoate, S. L. et al. (1974). *Immunochemistry* **11**, 75.
Kuss, E. and Goebel, R. (1972). *Steriods* **19**. 509.
Lindner, J. R. et al. (1972). *Steroids* **19** 357.
Ling, C. H. and Overby, L. R. (1972). *J. Immunol.* **109**. 834.
Marks, V. et al. (1974). *Brit. Med. Bull.* **30**, 80.
Matsukura, S. et al. (1971). *J. Lab. Clin. Med.* **77**, 490.
Midgley, A. R. (1966). *Endocrinology* **79**, 10.
Midgley, A. R. et al. (1971). *Recent Prog. Hormone Res.* **27**, 235.
Morgan, C. A. and Cook, I. D. (1972). *J. Endocrinol.* **54**, 445.
Nars, P. W. and Hunter, W. M. (1973). *J. Endocrinol.* **57**, Xl vii, (Abstract).
Niswender, G. D. et al. (1968). In: Rosembery, E., ed. "Gonadotrophins" pp. 299—306.
Odell, W. D. and Hescox, M. A. (1972). In: "Stucture-activity relationships of protein and peptide hormones", pp. 139—147.
Olivieri, V. et al. (1974). In: "Radloimmunoassay and related procedures in medicine", vol. 1.
Pierce, J. G. (1971). *Endocrinology* **89**, 1331.
Rabinowitz, et al. (1973). *Nature New Biol.* **245**, 245.
Ross, C. T. et al. (1972a). In: Margoulies, M. & Greenwood, J. C. ed. "Structure-activity relationships of Protein and peptide hormones", pp. 159.
Rouslaht, E. and Seppaelae, M. (1971). *Int. J. Cancer* **8**, 374.
Ryan, R. J. (1969). Acta Endocrinol. (Copenhagen) Suppl. no. 142, p. 300
Saxena, B. B. et al. (1968). *J. Clin. Endocrinal metab.* **28**, 519.
Searle, F. et al. (1974). *J. Immunol. Methods* **4**, 113.
Seppaelae, M. et al. (1972). *Int. J. Cancer* **10**, 478.
Stevens, V. C. (1969). Acta Eudocrinol. Suppl. No. 142, p. 338.
Tashjian, A. H. et al. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 1419.
Thomson, D. M. et al. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (U. S. A.) **64**, 161.
Vaitukaitis, J. et al. (1971). *J. Clin. Endoerinal. & Metal.* **33**. 988.
Vaitukaitis, J. et al. (1972). *Endocrinology* **91**. 1337.
Walsh, J. H. et al. (1970). *J. Infect Dis.* **121**, 550.
Youssofinejadian, E. et al. (1972). *J. Storiod Biochem.* **3**, 893.
上海实验生物研究所。瑞金医院(1973)中华医学杂志 1973 年 8 期，463 页。

第十二章　补体及其作用的分子基础

免疫学早期研究已经注意到免疫血清的杀菌和溶细胞作用。免疫学经典实验中，把羊红血球注射到家兔，产生抗羊红血球抗血清。这种抗血清能使羊红血球凝集，同时也能使之溶解。这一现象称为免疫溶血作用 (Immune hemolysis)，有关的抗体称为溶血素 (Hemolysines)。 这种抗血清使用前经 56°C 保温 30 分钟，便失去溶血能力。但仍然保持使羊红血球凝集的活力。此时如果再加入其他动物(如豚鼠)新鲜的正常血清，溶血能力又可恢复，而加过热的血清则没有这种作用。新鲜血清中存在的这种不耐热的，非专一的成分，能补充完成抗体的作用，因此称为补体 (Complement，简称 C)。

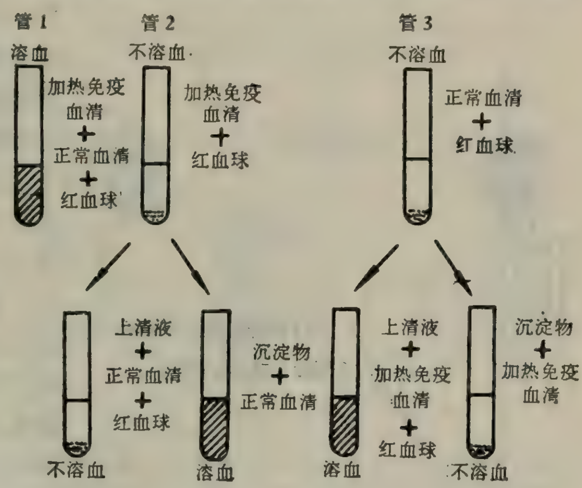


图 12-1　免疫溶血作用。此反应需要抗体 (加热免疫血清)与补体(正常血清)。根据管 2、3 以及测定其上清液和沉淀物的结果，可以证明抗体先与抗原结合，然后再与补体作用引起溶血 (据 Carpenter, 1956)。

从图 12-1 所示的实验，可以看出抗体首先要与红血球结合，然后正常血清成分 (C) 才能发生作用而引起溶血。因此，免疫溶血作用包括依次进行的两个主要过程：

1) 致敏细胞： 红血球 (E) + 抗体 (A)→红血球表面抗原抗体复合物 (EA)

抗体和红血球表面抗原专一地结合，而使细胞致敏。此过程决定溶血作用的专一性。

2) 溶血过程：EA + C→溶血

补体 (C) 被细胞表面抗原抗体复合物固定而被激活，导致细胞溶解。此过程是非专一的。

根据现有的知识，补体系统是一组血清蛋白质(包括至少 11 种血清球蛋白)，通常在有细胞结合的抗原抗体复合物存在时被依次地激活，形成一系列的酶，引起细胞膜的不可逆的变化，终于造成膜的完整性破坏。补体激活过程中，产生许多具有生物活性的片段，如过敏毒素 (Anaphylatoxin)，多形核白血球化学吸引素，调理素 (Opsonin) 等。 许多重要的免疫学现象，如免疫粘着 (Immune-adherence)，共凝集作用 (Conglutination)，过敏反应，正常和肿瘤细胞的杀伤等，都有补体或其产物参加。近来还发现补体能产生类似激肽作用的物质，并参与正常的凝血机制。由于这些多种多样的作用，补体具有重要的生理和病理的意义。总之，补体作为辅助抗体效应功能的分子，一方面参与对抗感染因素的防御机制；另一方面，又是免疫病理过程中引起组织损伤、炎症反应和过敏反应

的介导物质。

本章讨论补体系统的特性及其生物活力，补体反应的初级途径及支路，溶细胞作用机制，以及在机体的防御机制和病理生物学现象中的作用。

一、血清补体效价的滴定和补体固定

（一）血清补体效价的滴定

血清补体效价滴定，常用的标准系统包括：羊红血球（E）和溶血素，即用羊红血球免疫家兔得到的抗血清。由于豚鼠血清含有充分多的各种补体成分，故普遍用作补体的来源。补体滴定前，溶血素（家兔抗羊红血球免疫血清）须先在56°C 灭活30—50分钟。灭活的溶血素应含有有效的抗体（A），能与红血球表面抗原结合而使其致敏（形成 EA）。血清补体含量（效价）是用能引起致敏的羊红血球50％溶血所需的补体最小量来表示的，称为 C_{50} 单位。

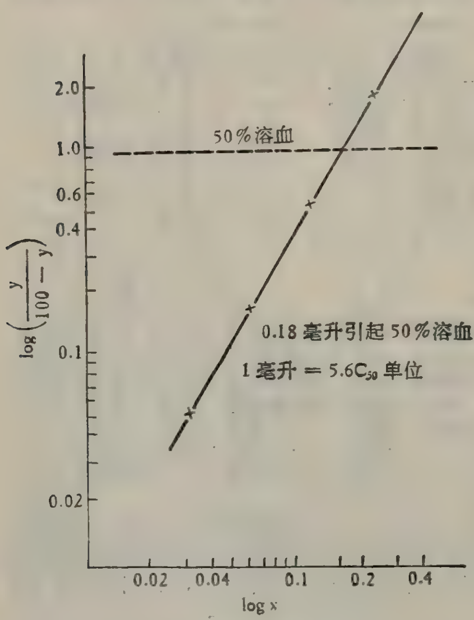


图 12-2 豚鼠血清中补体效价的测定。横坐标为加入的豚鼠血清体积（毫升）；纵坐标为log $\left(\frac{y}{100-y}\right)$（据 Haurowitz, 1968）。

溶血程度是在离心去除完好的红血球后，用比色法测量上清液中血红素的量来表示。例如，加1毫升稀释250、500和1000倍的豚鼠血清后，致敏红血球发生的溶血程度分别为30、50和75％时，则1毫升未稀释的原血清的补体效价为500 C_{50} 单位。如果将溶血百分率对所用豚鼠血清体积作图时，得到S形曲线。此曲线可用下述公式表示：

$$x = K\left(\frac{y}{100-y}\right)^{1/n}$$

其中，x = 稀释豚鼠血清的量（毫升）；y = 溶血百分率；指数 $1/n$ 通常条件下接近于0.2。当50％溶血时，括弧内的一项成为 $\frac{50}{100-50}=1$，结果 $K=x$。由此可确定 K 值。若将 $\log\left(\frac{y}{100-y}\right)$ 对 $\log x$ 作图，得到一条直线，其在 $\log x$ 轴上的截矩为 K，斜率等于 $1/n$（图12-2）。从图12-2可见，0.18毫升血清引起50％溶血，原血清1毫升应为5.6 C_{50} 单位（参看 Mayer, 1961）。

（二）补 体 固 定

补体不只是能与红血球（E）和抗体（A）的复合物结合，而且可以和大多数抗原抗

体（IgM，IgG）复合物结合。例如，抗 BSA 抗体和相应的抗原在新鲜豚鼠血清中形成沉淀，除去沉淀后的上清液不能再使致敏的红血球溶血。这种补体与抗原抗体复合物结合而在溶血系统中消失的现象，称为补体固定（Complement fixation）。游离的极微量的补体可用致敏的羊红血球溶血作用测出。当补体完全被另一抗原抗体复合物固定后，就无溶血作用发生。因此，补体固定常用作测定抗原抗体复合物形成的很灵敏的方法。其原理可用简图 12-3 表示。

临床医学检验常用的一些方法，如梅毒的华氏反应（Wassermann reaction）就是根据补体固定原理。这一方法也可用作其他抗原的测定，其灵敏度达到 1 微微克（10^{-9} 毫克）（参看 Mayer，1961）。

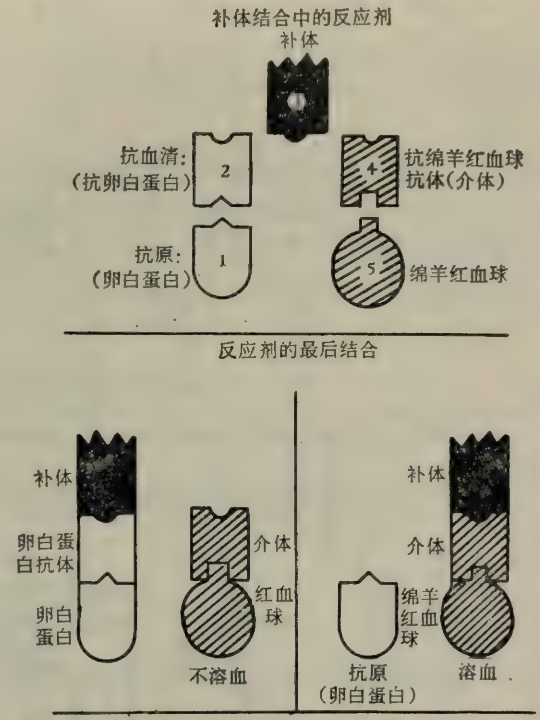


图 12-3 卵白蛋白补体结合反应。圆圈中的数字表示实验中所加反应物的次序。各反应物的量应加调节，使在实际实验中有卵白蛋白的抗体时，不发生溶血，反之，如无卵白蛋白抗血清，则补体游离，可与致敏红血球结合，结果发生溶血。

二、补体系统各成分的特性

（一）化学性质和分子构造

补体系统（C）是由 9 个不同的成分，或至少 11 个血清球蛋白组成的，分别称为 C1，C2，C3，C4，C5，C6，C7，C8，和 C9。成分 C1 至少又是由三个亚成分 C1q，C1r，C1s 组成的。这 11 种血清蛋白质现已分离提纯并鉴定其功能。

1. 补体各成分的分离和纯化

人类各补体成分先后分离提纯的年代如下：C1q（Müller-Eberhard 和 Kunkel，1961）；C1r（de Bracco 和 Stroud，1971；Valet 和 Cooper，1974）；C1s（Haines 和 Lepow，1964；Nagaki 和 Stroud，1969）；C2（Polley 和 Müller-Eberhard，1968）；C3（Nilson 和 Müller-Eberhard，1965；Molenaar 等，1973）；C4（Müller-Eberhard 和 Biro，1963）；C5（Nilsson 和 Müller-Eberhard，1965；Nilsson 等，1972）；C6（Arroyave 和 Müller-Eberhard，1971）；C7（Arroyave 和 Müller-Eberhard，1972a）；C8（Manni 和 Müller-Eberhard，1968）；C9（Hadding 等，1969）。近来，已成功地从同一个人血清样品中系统地分离出所有 9 种功能上纯的补体成分，其步骤见图 12-4（Vroon 等，1970）。利用这些纯化的补体成分作抗原，已能得到人类各种补体成分的专一的抗血清，因而便能用免疫电泳法鉴别它们。同时，还为临床检验提供了血清中各种补体成分比较简便的免疫化学定量测定方法（Nilsson 和 Müller-Eberhard，1965；Kohler

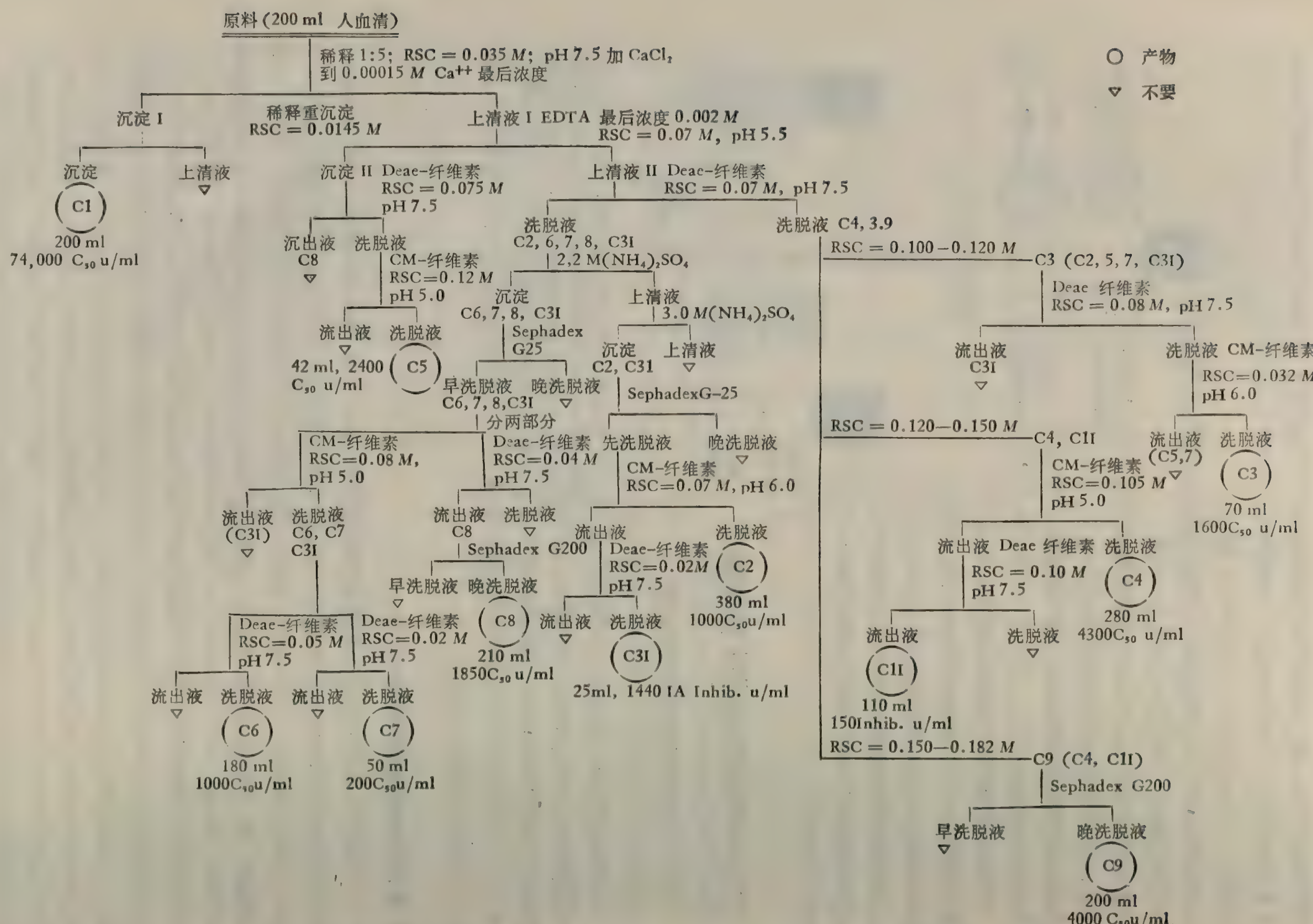


图 12-4 从一个人血清样品分离 9 种补体成分和 2 种灭活因子 (C3I 和 C1I) 的步骤. RSC = 相对盐浓度(Vroon 等, 1970)。

和 Müller-Eberhard, 1967; Ogg 等, 1968)。

实验动物补体成分的分离纯化工作,还没有达到这样完善的程度。豚鼠的各种补体成分中, C1q, C1r, C1s (Sassano 等, 1972), C2 (Mayer 等, 1970; Wagner 和 Röllinghoff, 1970), C3 (Shin 和 Mayer, 1968), C5 (Cook 等, 1971) 已经提纯。家兔只有 C1q (Volanakis 和 Stroud, 1972) 和 C6 (Arroyave 和 Müller-Eberhard, 1971) 的纯化已有报告。

所有补体成分都是大分子。除 C1q 外,都以不活动形式存在于血清或血浆中,需要被依次地激活才能起作用。激活的补体或补体的复合物(通常具有酶活力),可用成分或几个成分的符号上加横线表示,如 $C\overline{1}$, $C\overline{423}$ 等。补体成分、中间复合物以及片段等的命名和简写,可以参看世界卫生组织在1968年制定的《补体命名原则》(WHO, 1968) (表 12-1)。

表 12-1 补体成分及产物的名称和简写

C1—C9	代表"经典的"补体成分,即致敏的羊红血球用稀释的正常豚鼠血清或人血清溶血时所需的成分。
$C\overline{n}$	表示补体成分序号的数字上加一条横线代表处于激活状态的补体成分,通常具有酶活力。
Cn*	星号代表暂时存在的结合状态。
Cni	后缀 "i" 代表先前的活性成分的失活状态。
Cna 和 Cnb	代表一种补体成分经酶解衍生出来的片段; "a" 片段较小。
C1 的亚成分	用后缀 "q", "r", "s", "t" 表示。

2. 补体成分的一般理化性质

人的各补体成分的理化性质列于表 12-2 (Müller-Eberhard, 1975); 聚丙烯酰胺凝胶电泳图形见图 12-5。

从表 12-2 可见,各种补体蛋白质的分子量范围变动很大,从 79,000 到 400,000。大多数成分的电泳迁移率属于 β-球蛋白,而 C1q 和 C8 属于 γ-球蛋白。C1s 和 C9 属于 α-球蛋白。至少有一些成分 (C1q, C4, C3 等)含多醣,其功能意义还不清楚。

表 12-2 人补体蛋白质的理化性质

补体蛋白质	血清内浓度 (微克/毫升)	沉降常数 (S)	分子量	相对电泳迁移率	肽链的数目
C1q	180	11.1	400,000	γ_2	18
C1r	—	7.5	180,000	β	2
C1s	110	4.5	86,000	α	1
C2	25	4.5	117,000	β_1	—
C3	1600	9.5	180,000	β_2	2
C4	640	10.0	206,000	β_1	3
C5	80	8.7	180,000	β_1	2
C6	75	5.5	95,000	β_2	1
C7	55	6.0	110,000	β_2	1
C8	80	8.0	163,000	γ_1	3
C9	230	4.5	79,000	α	—

(据Müller-Eberhard, 1975)。

3. C1 大分子复合物及其亚成分的构造和相互作用

C1 之三个亚成分（C1q，C1r，C1s），在血清 Ca^{++} 离子强度条件下，被 Ca^{++} 连结成一个 18S 复合物形式存在。用 EDTA 处理去除 Ca^{++} 时，复合物解离为 C1q，C1r，C1s 亚基，分子大小分别为 11S，7S，4S。再加钙又可恢复。因此，一般认为在生理条件下，C1 复合物是作为一个功能单位起作用的，即通过 C1q 与免疫复合物结合，引起亚基间的相互作用，而使酶原亚基（C1s）激活。激活的 $C\bar{1}$ 再发动补体系统的连锁反应。可是，近来发现纯化的 C1q、C1r 和 C1s 加钙离子时形成的大分子复合物，其沉降常数只有 15—16S，比上述血清 C1 复合物的沉降常数小。这提示可能存在另一个亚成分 C1t。后来果然从血清中分离出来，并证明是一个分子量为 233,000（9.5S）的 α_1 糖蛋白。电子显微镜下，分子呈五角形（直

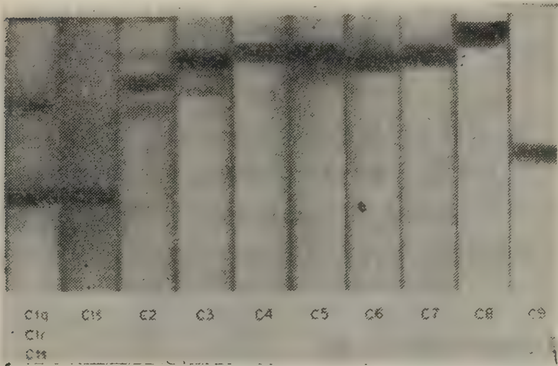


图 12-5 碱性 pH 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示人血清的 11 种补体蛋白质。左侧凝胶含有 C_1 复合物解离的 3 成分，C1q居上，C1r 居中，C1s 最下面。C_2，C_3，C_4 和 C_5 样品中常出现电泳速度转快的物质。由于和主要补体成分在免疫化学上有关系，这些物质是补体成分的不活动转化产物，这表明这些蛋白质很不稳定(据 Müller-Eberhard, 1972)。

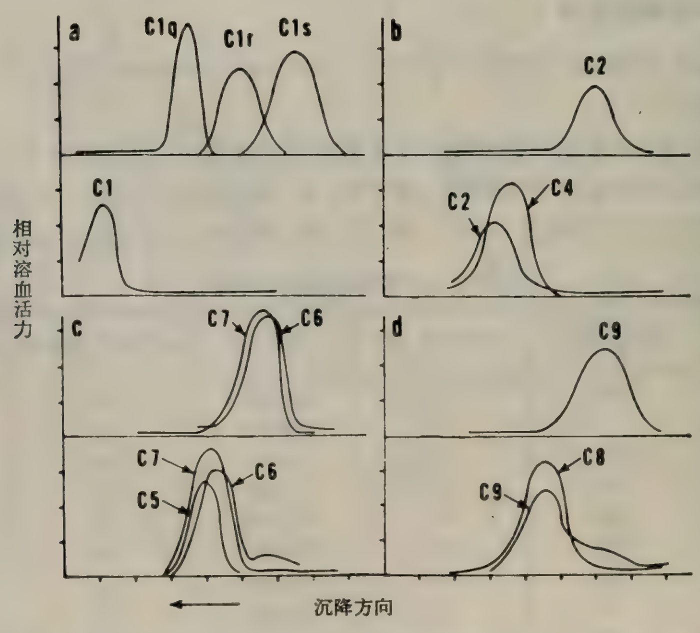


图 12-6 密度梯度超离心法显示天然补体蛋白质的可逆相互作用。(a) 缺 Ca^{++} 条件下，C1q，C1r，C1s 各以 11S，7S，4S 速度分别沉降；有 Ca^{++} 时，3 种蛋白络合成一个 18 S复合物。(b) 无 C_4 时，C_2 以 5.5S 速度沉降；有 C4(S = 10S)，C2 在 C4 范围内沉降。(c) C6 和 C7 沉降率为 6S；有 C5 (S = 8.7S)，两蛋白质均在 C5 范围内沉降。(d) C9 沉降率为 4.5S；当和 C8 (S = 8S) 混合时，沉降速度大于 8S (据 Müller-Eberhard, 1972)。

径 85 Å）（Assimeh 和 Painter，1975；Pinteric 等，1976）。因此，该作者认为 C1 是 C1q，C1r，C1s 和 C1t 四个亚成分的大分子复合物。对于 C1 激活过程中，各亚基相互作用关系的看法自然也应有所改变。不过，C1t 的存在，目前尚未得到普遍承认。

另一些补体蛋白质在激活以前也表现出选择的亲合性，形成可逆的复合物，如天然的 C2，C4 形成 13S 复合物；C5，C6 和 C7 形成一个 9—10S 复合物。这些过程可以从超离心场中的沉降行为检测出来（Müller-Eberhard，1969）（图 12-6）。

（1）C1q 构造特点——类似胶原的糖蛋白

一些补体成分的氨基酸组成已有报告。C3，C4，C5 的氨基酸组成具有血清球蛋白的特点。可是，C1q——血清蛋白中碱性最强的蛋白质，其化学组成却很特别，含有羟赖氨酸、羟脯氨酸和大量甘氨酸；其糖基团主要含葡萄糖和半乳糖，并且葡萄糖、半乳糖与羟赖氨酸几乎是等克分子量的（表 12-3）。这种化学组成有些类似胶原，而不象血清球蛋白。

表 12-3 C1q 糖蛋白的性质

分子量	400,000
亚基分子量	67,000
氨基酸	%w/w
脯氨酸	5.4
甘氨酸	10.0
OH-赖氨酸	2.0
OH-脯氨酸	4.9
糖	%w/w
中性己糖	8.5
葡萄糖	2.7
半乳糖	2.7

（据 Calcott 和 Müller-Eberhard，1972）。

很可能和胶原一样，C1q 也具有葡萄糖-半乳糖双糖单位，通过羟基和羟赖氨酸相连接的构造。这种奇特的化学组成和 C1q 分子构造的特点有关系。

对 C1q 的亚基和肽链结构研究发现，C1q 经 8*M* 尿素解离成两种非共价结合的亚基，A 亚基（分子量 69,000）和 B 亚基（分子量 54,000）。C1q 经还原和烷基化后，产生等克分子量的三种多肽链（A，B，C），其分子量均约为 23,000—24,000。这些多肽链的共同特点是具有类似胶原的结构，都含有很高量的甘氨酸（～18%）和胶原特有的羟赖氨酸和羟脯氨酸（Calcott 和 Müller-Eberhard，1972）。对人 C1q 的 A 链（全长 191 氨基酸残基）的部分排列顺序测定结果发现，其 N 端半段（78 残基）具有和胶原类似的 Gly—x—y 重复顺序（x 多为 Pro，y 多为羟脯氨酸），而 C 端则有非胶原类型的排列顺序。B 链和 C 链也可能存在同样的类似胶原的区域（Reid，1974）。最近，还发现 C1q 经胃蛋白酶在 pH4.4 部分酶解时，非胶原排列顺序被切成碎片，而类似胶原结构部分仍保持完整。对这些残留的片段分析表明，一种片段是 A 链和 B 链在近 N 端处经二硫键连成的双链，另一种片段是两条 C 链在近 N 端处经二硫键连成的双链（Reid，1976）。

另一方面，电子显微镜观察发现，C1q 分子形状像一把没有完全打开的折扇（Svehag

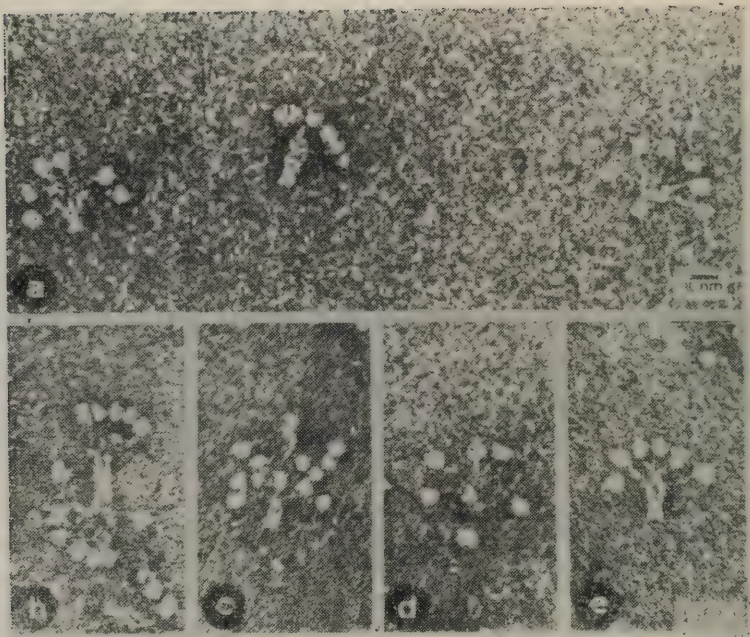


图 12-7　C1q 分子之不同方面的电子显微镜图。（×500,000)。 (a) 三个不同的 C1q 分子的侧面观。 (b) 和 (c) C1q 分子的双体的两种排列方式；(b) 中央亚基相连， (c) 周沿亚基相连。 (d) C1q分子上面观。 (e) C1q 分子侧面观。 中央亚基似乎再纵分为两部分(据 Knobel 等,1975)。

等，1972；Shelton 等，1972；Knobl 等，1975)（图 12-7，12-8)。“扇柄”(中央亚基)的大小约为 50 Å ×100 Å，由两个部分组成；周沿排列着 6 个球形亚基，以细丝和“扇柄”相连。这些周沿球形亚基的大小为 65 Å，Knobl 等推测可能和亚基 A 的大小大致符合，而相连的细丝(15 Å ×100—300 Å) 从其粗细推测其结构可能类似三股螺旋的胶原。因此，每一条细丝可能代表类似胶原的三股螺旋结构，而细丝末端的球相当于这些多肽链 C 端非胶原结构的区域。至于中央亚基则假定可能相当于B亚基，由两条小的肽链(26,500) 组成 (Knobl 等，1975)。

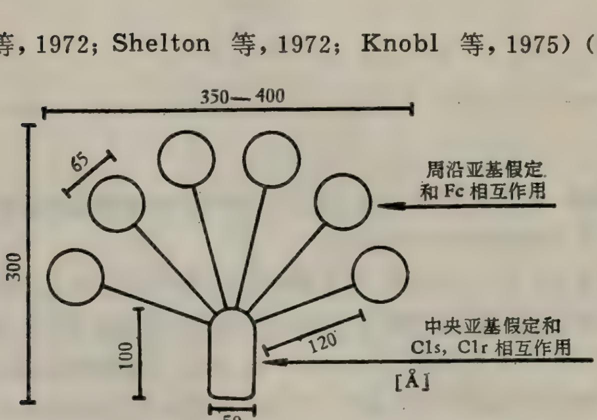


图 12-8　根据电子显微镜观察作出的 C1q 分子简图 (据 Knobel 等，1975)

最近，Porter 和 Reid (1976) 根据前述对 C1q 胃蛋白酶酶解片段的研究结果，并参考电子显微镜观测资料，提出一个 C1q 新的分子结构模型。假定每一个 C1q 分子 (分子量 410,000) 是由 9 个非共价结合的亚基 (6 个为 A—B 双链，3 个为 C—C 双链) 组成的。每两个 A—B 双链和一个 C—C 双链作为一个结构单位，其中 A, B, C 链的类似胶原区域 (78 残基) 盘绕成一条三股螺旋的纤维，而 C 端非胶原区域的肽链折叠成一

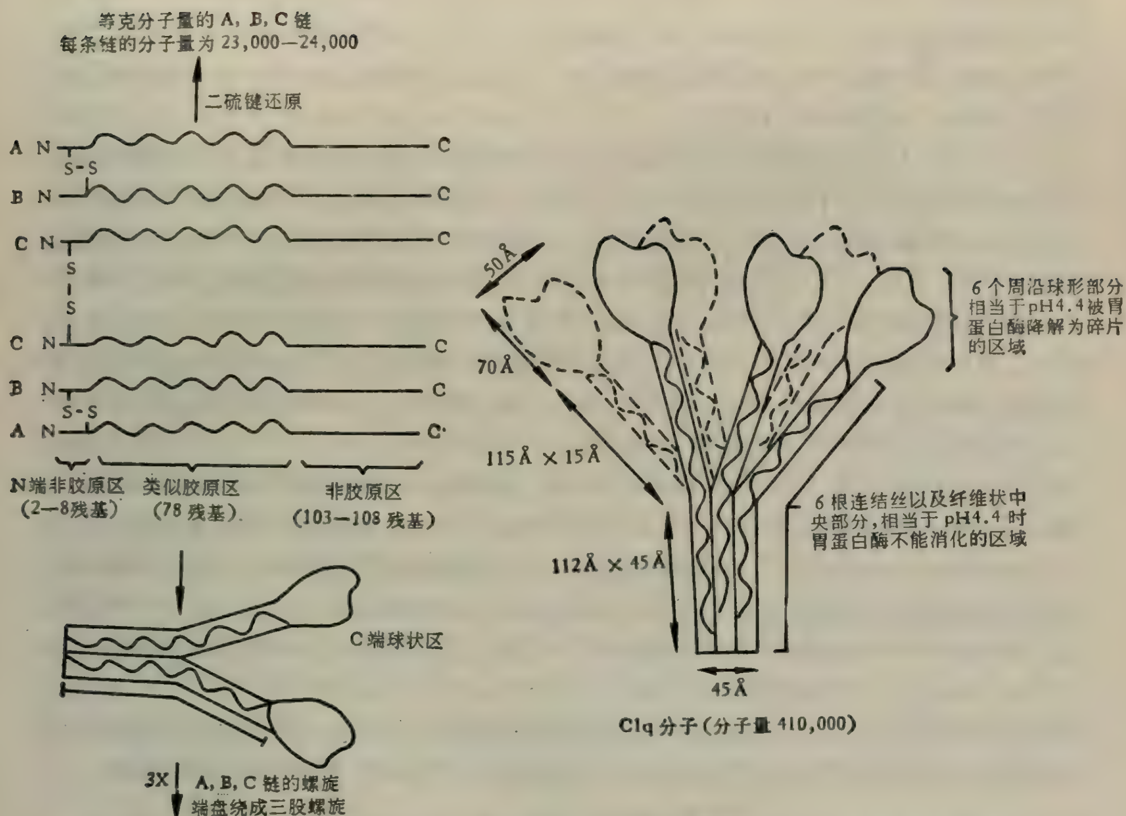


图 12-9 人 C1q的分子模型和肽链构造。根据对 C1q 胃蛋白酶酶解片段的研究结果 (Reid, 1976) 及电子显微镜观测 (Shelton 等,1972; Knobel 等,1975),并假定 A, B, C 链的三个类似胶原区盘绕成类似胶原的三股螺旋的纤维构造，C 端非胶原区折叠成周沿球形构造。(——) 分子朝外的部分；(———) 分子朝内的部分；(〰) 类似胶原的三股螺旋构造(据 Reid 和 Porter, 1976)。

个周沿的球形构造。结果每一个结构单位有两条三股螺旋及与其相连的两个球形构造。整个 C1q 分子再由三个这样的结构单位非共价结合，形成电子显微镜下所见的“扇形”构造(图 12-9)。

已知完整的 C1q 分子和 IgG 相互作用的价数为 5—6 价。上述的分子亚显微结构提示，每一个周沿球形亚基也许相当于一个和 IgG 的结合点，而中央亚基则可能和 C1r 或(和)C1s 相互作用。利用同位素标记的胶原酶酶解片段 (^{125}I-C1q 片段)作的实验证实了这种看法，相当于球形亚基的片段能和免疫复合物结合 (Isliker 等，1974)。

(2) C1 大分子复合物中各亚成分的相互作用

纯化的 C1r 是一个 7.0S 大小的糖蛋白。在生理条件下，是由分子量 95,000 的两条相同的多肽链非共价结合而成的。在有钙离子存在的条件下，C1r 对 C1s 或激活的 $C\bar{1}s$ 都有很高的亲合力 (Ziccardi 和 Cooper, 1976)。纯化的 C1r 经体外保温后能自动地激活 C1s，这种激活作用能被 DFP (二异丙基氟磷酸 Diisopropyl flurophosphate) 抑制。^{125}I-C1r 和致敏羊红血球的结合需要 C1q 和钙离子存在，而不需要 C1s。然而，^{125}I-C1s 和致敏羊红血球的结合，则需要 C1q，C1r 和钙离子同时存在。由此可见，C1r

的作用可能不只是激活 C1s，并且在形成 C1 大分子复合物时似乎还可能充当 C1q 和 C1s 之间的连结环节（Ziccardi 和 Cooper，1976）。此外，还发现标记抑制物 ^{32}P-DFP 能和 C1s 的一个小片段结合，提示这一片段上可能存在和 C1r 相互作用的活性位点（Sakai 和 Stroud，1974）。

关于 C1 大分子复合物的构造，近来又有新的报告。有人用亲合层析（琼脂糖-IgG）法从血清中分离出一个新的亚成分 C1t。还进一步研究了血清 C1 复合物和纯化的 C1 亚成分在琼脂糖-IgG 柱上的亲合层析行为（Assimeh 和 Painter，1975）。血清通过琼脂糖-IgG 柱时，C1 各亚成分便被结合在柱上。再用 EDTA 洗脱时，只有 C1s 和 C1t 解离，而被洗脱下来。反之，若用加过 EDTA 的血清上柱，则只有 C1q 和 C1r 被结合。当用纯化的四种 C1 亚成分作亲合层析时，进一步证实 C1q 和 C1r 各自独立地和 IgG 结合（有证据表明 C1q 和 C1r 是和 IgG 的 Fc 上不同部位结合）；而 C1s 和 C1t 则需要通过 Ca^{++}，和这些复合物结合。这些证据表明血清中 C1 大分子复合物可能是按：琼脂糖-IgG:C1q:C1t:C1s:C1r:IgG-琼脂糖，这样的空间顺序和相邻的两个 IgG 分子结合的，而不是像过去一般认为只是通过 C1q 和 IgG 结合的。从这种 C1 大分子构造的新认识出发，对于 C1 激活过程中各亚基相互作用关系的看法也应有所改变。C1 的激活过程可设想为 C1r 和 C1q 各自独立地和相邻的 IgG 分子 Fc 不同部位结合。结合的 C1r 不依赖 C1q，便能直接激活 C1s。不过要引起溶细胞作用，则需要 C1q 和 C1r 同时各自独立地和相邻的 IgG 分子结合。总之，从上述可见，C1 大分子复合物亚基间的相互作用是非常复杂的现象，目前还不甚清楚。此外，C1t 的存在目前并未得到普遍承认。因此我们在下一节中讨论 C1 激活的分子机制时，暂时仍沿袭旧的概念。

4. C3 的多肽链构造

C3 在补体系统的功能活动中起关键作用，其分子构造和功能的关系也是颇为复杂的。纯化的 C3 分子是由两条多肽链共价连接而成的，α 链分子量为 120,000，β 链为 75,000，总共为 195,000。C3 在经 C3 转化酶激活时，从 α 链的 N-端切下一个小片段 C3a（分子量 9,000），剩下的大片段 C3b（分子量181,000）上原来被掩盖的结合点暂时便暴露出来了，并能和细胞膜上的受体非专一地结合。新产生的 C3b 和膜的结合似乎是通过 C3d，因为当 C3 灭活因子或胰蛋白酶作用于和膜结合的 C3b 时，释放出C3c 而不是 C3d。C3a(α1)，C3d(α2) 都是 α 链的片段，而 C3b 则包括两条链（α 和 β），C3c 则是完整的 β 链和 α 链的一系列片段，经几个二硫键相连构成的（图 12-10）（Bokisch 等，1975）。C3a 是一个碱性很强的多肽，其结构特点是含有大量的 α 螺旋构造，可能与其过敏毒素的生物活性有关系（见 385 页）。

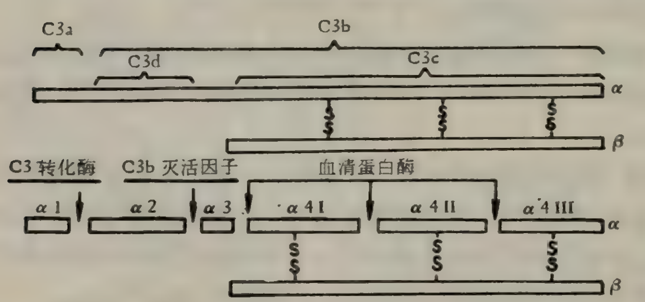


图 12-10 C3 分子模型。表示多肽链与生理的及酶解的片段之间的关系（据 Bokisch 等，1975）。

5. C4 和 C5 的多肽链构造

C4 的分子量为 206,000。由 α，β，γ 三条多肽链构成，几条链的分子量各为 95,000，78,000 和 33,000（Schreiber 和 Müller-Eberhard，1974）。C4 的 α 链被 C1$\bar{s}$ 酶解为 C4a 和 C4b 两个片段。C4b 有一个新的稳定的结合点，能和许多哺乳动物细胞表面的免疫附着受体结合。C4b 的 α 链进一步被 C4b 灭活因子酶解为 C4d 和 C4c 两个片段，并失去原有的 C4b 活力（图 12-11）。

C5 的分子量为 180,000，由 α，β 两条链组成。α 链分子量约为 110,000，β 链约为 70,000（Bokisch 和 Müller-Eberhard，1975）。C5 的 α 链可被 C5 转化酶切成 C5a 和 C5b 两个片段（图 12-11）。

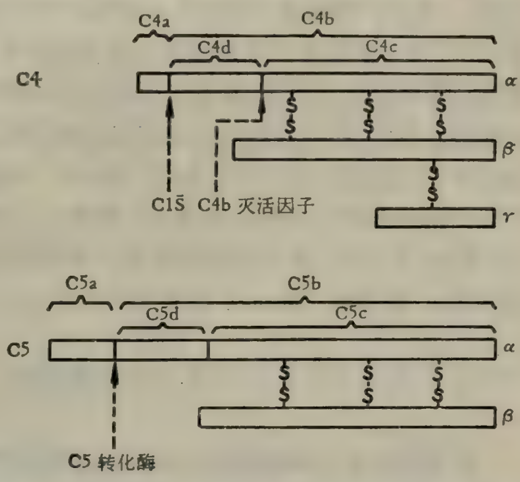


图 12-11 C4 和 C5 的分子模型。表示多肽链与生理的片段之间的关系（据 Müller-Eberhard, 1975）。

其他补体成分的分子构造，目前还不甚清楚。

（二）血清内含量

补体系统的 11 种以上的蛋白质共占血清球蛋白部分总量的约 10%。血清中各补体成分含量的差异很大，从<10 微克到>120 微克/毫升（表 12-2，图 12-12）。不同物种，各成分的相对浓度不同。这种浓度差异可能反映了补体最适生物学功能所需的个别成分的量。补体担负的各种生物学功能，如溶细胞作用或加强吞噬作用等在机体防御系统中的相对重要性，在不同物种或同物种不同品系之间可能不同。因此，某些种或品系的某些成分可能含量较高。如对于溶细胞作用要求 C3 分子特别多，实际上人类血清中，C3 含量也最高。这表明在人类溶细胞作用可能是维持个体完整性的

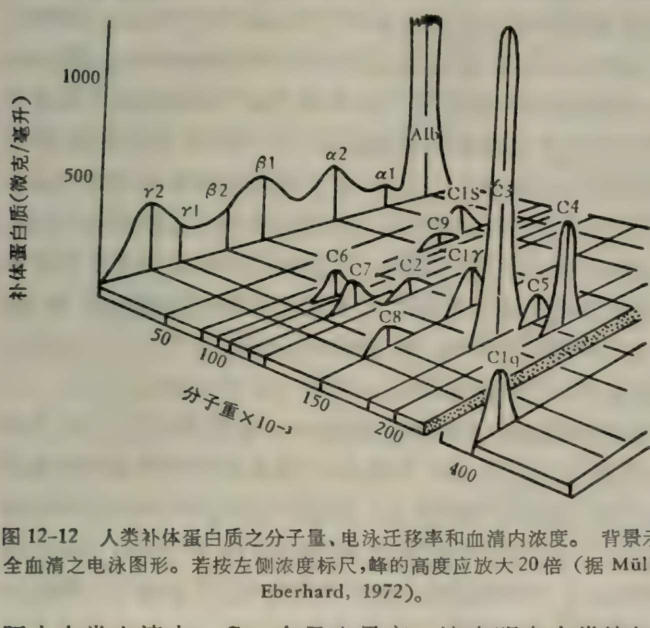


图 12-12 人类补体蛋白质之分子量、电泳迁移率和血清内浓度。背景示人全血清之电泳图形。若按左侧浓度标尺，峰的高度应放大 20 倍（据 Müller-Eberhard, 1972）。

重要机制。

各种疾病情况下，血清内补体成分含量常发生典型的变化（Schur 和 Austen, 1968）。许多炎症，如类风湿性关节炎、皮肌炎、集结性动脉外膜炎患者，血清内补体水平升高。许多严重蛋白尿病人，血清中 C3 水平升高；Bence-Jones 髓细胞瘤病人血清中，C4 水平比正常人升高八倍。血清中补体水平升高的原因还不清楚。有人认为这可能是由于补体合成过多，如果天然的补体抑制物又失效的话，结果就可能造成溶细胞能力的增高。反之，在有些疾病开始后，溶细胞活力降低。如急性肾小球肾炎，补体的总活力连续 3—5 周保持在低水平，其中 C2、C3 水平降低，而 C1、C4 水平不降低。活动性全身性红斑狼疮病人补体总量和 C3 都降低。但与链球菌感染后继发的急性肾小球肾炎不同，C1q 和 C4 水平也降低而 C5 水平保持正常，故可作为两种疾病鉴别诊断的指标（Kohler 和 Ten Bensel 1969）。

（三）补体的生物合成和代谢

根据胚胎发育和组织培养等方面研究，证明补体不同成分是在不同的组织内合成的。已知 C1 是在肠胃道上皮细胞内合成的（Colten 等，1966；1968）；C2 和 C4 是由巨噬细胞合成的（Rubin 等，1971；Stecher 等，1967）；C3 主要是由肝脏合成的（Alper 等，1969）；C6 和 C9 也可能是肝脏合成的；C5 和 C8 是由脾脏内细胞合成的。C7 合成地点还不清楚。

大多数补体成分的代谢率不清楚。放射性同位素标记实验证明 C3 在健康人体内的合成率为 1.16 毫克/公斤体重/小时；血清内消失半衰期为 58 小时。近来，用离体培养的豚鼠腹膜细胞（HVW 细胞株）实验表明，每一细胞每小时能合成 310 个有效的 C2 分子（Wyatt, 1974a,b）。

在人类和动物，都可能出现缺少某些补体成分的遗传病（Alper 和 Rosen, 1972），如人类 C3 缺乏病（Alper 等，1970）和 C5 缺乏病（Miller 和 Nilsson, 1970），小鼠 C5 缺乏病（Shin 等，1969）和家兔 C6 缺乏病（Rother 等，1966）等。在患有这种遗传缺陷造成的分子病的个体，补体反应链锁由于失去某一环节而不能行使正常的防御功能，结果机体对抗感染的能力便大大降低了。近来，有人发现对于缺乏 C4 为纯合子的豚鼠，其腹膜细胞在离体培养时能产生一种调节因子，诱导来源于人类肿瘤的 HeLa 细胞合成有效的 C4 分子。并且这种有遗传缺陷的细胞产生这种因子的能力比正常豚鼠细胞要大 5—10 倍。从豚鼠细胞产生的调节因子能调节人类有关细胞的基因功能看来，这种因子的作用似乎是没有物种专一性的（Colten 和 Wyatt, 1972）。

更值得注意的是对这类遗传缺陷进行“修复”的尝试。

对于正常小鼠，已知脾脏巨噬细胞是合成 C5 的地点之一。遗传上缺乏 C5 的小鼠（B10·D2/O）的脾脏巨噬细胞丧失了合成 C5 的能力。如果把这种有遗传缺陷的巨噬细胞和正常小鼠的肾脏细胞或鸡红血球作细胞杂交，这样产生的杂交细胞便能在体外产生 C5。把这些杂交细胞接种到缺乏 C5 小鼠体内，结果血清内便出现有生物活力的 C5，并且抗原性和小鼠 C5 相同。这一实验证明在哺乳类遗传缺陷“修复”的可能性，并为人类补体遗传缺陷病的治疗提供了一线希望（Levy 等，1973）。

三、免疫溶细胞作用

免疫溶细胞作用是最引人注目的免疫学现象，需要全套补体反应成分(“经典”成分)参加,可作为补体功能活动的代表。这一过程包括细胞表面抗原、专一的抗体和补体系统间的复杂的相互作用,而使补体各成分依次地激活,最后导致细胞表面不可逆的损伤和细胞的溶解。溶细胞作用机制主要是用溶血系统进行研究的。为了便于了解这一复杂过程,先将溶血过程的梗概简述如下：

(一) 免疫溶细胞作用中补体反应的顺序
(初级途径或“经典”途径)

细胞膜表面抗原和专一抗体分子 (IgM 或 IgG) 的 Fab 抗原结合位点相互作用的结果,激活或暴露出位于 Fc 片段上的补体结合位点，而与补体第一成分的 C1q 起反应，由此发动至少有 11 个补体蛋白质参与的链锁反应，最后导致膜的损伤。这种从免疫复合物和 C1q 相互作用开始,包括全套补体成分参加的反应系列，称为补体反应的初级途径或“经典”途径 (Primary or “classical” cascade) (Müller-Eberhard, 1969;1972)。

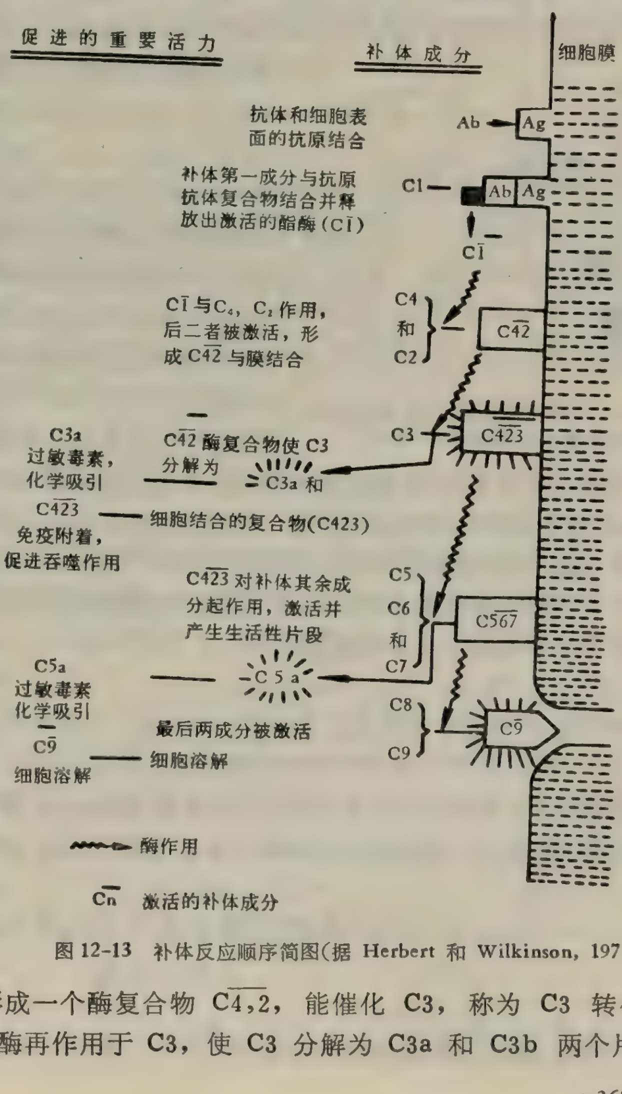


图 12-13 补体反应顺序简图(据 Herbert 和 Wilkinson, 1971)。

补体反应的初级途径如简图 12-13 所示，首先是专一的抗体 (1 IgM 分子或 2 IgG 分子) 和细胞表面抗原结合，形成一个固定补体的点 (细胞致敏)。C1 复合物 (C1q, r,s) 被膜上结合的抗体固定而被激活，转化为具有酯酶活力的激活的 C$\overline{1}$。C$\overline{1}$ 酶催化 C4，激活的 C4 附着到膜上新的地点 (或 C$\overline{1}$-抗原抗体复合物上)。同时 C$\overline{1}$ 酶也催化 C2，激活的 C2 和 C4 连接共同形成一个酶复合物 C$\overline{4,2}$，能催化 C3，称为 C3 转化酶 (C3 Convertase)。C3 转化酶再作用于 C3，使 C3 分解为 C3a 和 C3b 两个片段。

C3b 与 $C\overline{4,2}$形成能与细胞膜结合的新的肽酶$C\overline{4,2,3}$，而 C3a 游离，表现过敏毒素和白血球化学吸引的能力。酶$C\overline{4,2,3}$ 再和 C5 反应，使 C5 分解为 C5a（过敏毒素和化学吸引）和 C5b 两片段。C5b 再与 C6、C7 形成复合物。当有 C6 和 C7 存在时，$C\overline{4,2,3}$ 对 C5 的作用更有效得多。因此，C5、6、7 可能作为一个复合物而起作用。激活的 $C\overline{5,6,7}$ 和膜附着。$C\overline{5,6,7}$ 又激活 C8，使后者附着到膜上。当没有 C9 存在时，C8 可持久地但微弱地造成膜的损伤。C9 可以大大加强 C8 的溶细胞活力，而迅速地导致不可逆损伤（离子主动运送被破坏，释放出血红蛋白和其他内含物），造成渗透压不平衡，最后发生细胞的裂解。

从上述可见，完成免疫溶细胞作用，需要全套补体成分，按严格时空顺序，依次激活。为什么免疫溶细胞作用需要这样复杂的、按顺序触发的多分子酶系统，而不能由一、两种酶来完成呢？如果考虑到补体系统的功能是杀伤靶细胞（微生物或转化的寄主细胞），同时又要避免损伤寄主正常细胞的危险性，对于上述复杂机制的需要，就不难理解了。从理论上考虑，补体系统只有区分为“识别”、“激活”和“攻击”三个功能单位，同时又各以不活动形式存在，才有可能有效地和安全地完成这一任务（图 12-14）。既然对靶细胞的识别功能是由抗体担任的，补体的“识别”单位就应该和抗体有亲合力，通过和抗体靶细胞复合物的结合，再作用于“激活”单位。其次，“激活”单位应对细胞膜有亲合力。固定在膜上的“激活”单位再作用于“攻击”单位，使后者和膜结合，最后造成膜的损伤。所有上述的分子活动都是在靶细胞膜的局部发生的。“激活”和“攻击”单位、处于活动状态的分子或复合物都是非常不稳定的，除非与膜结合否则很快就会蜕变失去活力。因此，补体造成的损伤作用，只能局限在为抗体识别的外源细胞的局部，而不致扩展到邻近的正常细胞。只要抗体的识别能力是正常的，这种机制就能保证免疫溶细胞作用对靶细胞有选择地和有效地攻击，而不致有误伤正常细胞的危险。如果抗体的正常识别机制破坏了，不能区分“自我”和“非我”，随之而来地就会招致正常细胞的杀伤，引起自身免疫病。

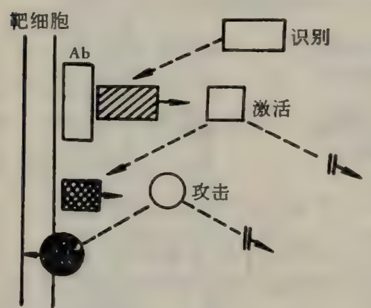


图 12-14 补体作用系统的三单位理论模型（据 Müller-Eberhard, 1972）。

上述这种三功能单位组合的理论模型和实验事实也是符合的，不过每一功能单位可能包括几种补体蛋白质。其组成如下：

1）“识别”单位：C1q，C1r，C1s；

2）“激活”单位：C2，C3，C4；

3）“攻击”单位：C5，C6，C7，C8，C9。

前面讲过，在超离心场中，C1q、C1r 和 C1s；C2 和 C4；C5、C6 和 C7；C8 和 C9 倾向于结合成可逆的复合物（图 12-6），也似乎支持上述看法。

（二）靶细胞表面结合抗体使补体激活的分子机制

按照上述理论模型，免疫溶细胞作用的分子机制可分为三个步骤，讨论如下：

1. 补体“识别”单位被靶细胞表面结合抗体激活——$C\bar{1}$ 的产生

(1) C1 复合物和抗体的相互作用

血清中 C1q、r、s 三个亚成分由 Ca^{++} 连结成一个 18S 复合物，作为一个功能单位起作用。C1 复合物通过 C1q 结合点而与抗原抗体复合物或免疫球蛋白聚集物相结合。这种结合是专一的，C1q 只与 IgG，IgM 结合，而不与 IgD 或 IgE 聚集物结合。IgG 的各亚类中，IgG_1、IgG_2、IgG_3 能固定 C1，而 IgG_4 则不能（Ishizaka 等，1966；1967）。如七章所述（205 页），固定补体的专一性是和重链 Fc 的特殊结构有关系的。

C1 复合物对抗体分子的亲合力和专一性位于 C1q 上，这为纯化的 C1q 在超离心场中能和 IgG 髓细胞瘤蛋白质相互作用形成 C1q-IgG 复合物的实验所证实。由此还可测定 C1q 和 IgG 的结合价，已测知为 5—6 价，即每一个 C1q 分子有 5—6 个结合位点，其结合常数为 $10^4—5\times10^5$ L/M（Müller-Eberhard，1972）。C1q 和 IgG 各亚类的亲合力不同：$IgG_3>IgG_1>IgG_2$。IgM 也能与 C1q 结合（Müller-Eberhard 和 Calcott，1966）。因此，可认为 C1q 是补体系统的“识别”单位，通过它把抗原抗体系统和补体系统在功能上连结起来，扩大抗体分子的效应功能。

(2) C1 的激活

补体各成分至少具有两类功能点：1）结合点，选择地和 Ig、补体成分或生物膜的受体结合；2）效应点，完成在免疫溶细胞反应中所分担的特殊功能。天然的补体成分不表现这些功能。补体成分表现功能需要激活。不过，C1 是唯一的例外，其结合点位于 C1q，无需激活就能直接和抗原抗体复合物起反应。当 C1 复合物（有 Ca^{++} 存在时）通过 C1q 和细胞膜上的免疫复合物（EA）结合后，C1r 便被激活。后者再作用于 C1s（酶原），使它转变为有活性的酶*：

$$\mathrm{EA}\ \underset{Ca^{++}}{\overset{C1q,\,r,\,s}{\rightleftharpoons}}\ \mathrm{EAC\bar{1}}$$

激活的 $EAC\bar{1}$ 具有酯酶活力；酶活力位于 $C1\bar{s}$ 上。$C1\bar{s}$ 酶的天然底物是 C2 和 C4；也能水解对-甲苯磺酰精氨酸甲酯（TAME），并可被二异丙基氟磷酸（DFP）抑制。正常血清内也含有 C1 的天然抑制物，抑制其酯酶活力。一些蛋白酶如溶纤酶或胰蛋白酶也可能使 C1 直接转变为 $C\bar{1}$。

C1 的激活作用的分子机制可能是由于 C1q 和抗原抗体复合物结合时，发生构象变化，引起 C1 复合物内亚基之间的空间重排列的结果。近来的研究结果认为，C1 复合物内部的激活始于 C1q 的构象变化，继而诱发 C1r 的构象变化，使 C1r 获得酶活力，作用于 C1s，将后者转化为活化的 $\overline{C1s}$。这一转化过程包括多肽链在一处切断，结果产生由二硫键连接起来的两个片段（重片段的分子量为 59,000，轻片段为 27,000），$\overline{C1s}$ 的酶活性中心位于轻片段（Sakai 和 Stroud，1973；Valet 和 Cooper，1974）。

---

* 如前一节（366 页）所述，有人认为 C1q 和 C1r 都能分别独立地和 IgG 之 Fc 的不同部位结合。纯化的 C1r 经体外保温后，还能自发地激活 C1s，而无需依赖 C1q。在生理条件下是否同样如此，还不清楚。

2. 激活单位在膜上的形成——$C\overline{4,2,3}$的产生

激活的 $C\bar{1}$ 酶可催化 C4 和 C2 与细胞膜结合，形成 C3 转化酶（$C\overline{4,2}$）。

在 $C\bar{1}$ 作用下，C4 分解为两个片段 C4a（分子量约为 15,000）和 C4b（分子量约为 230,000）（图 12-11）。大片段 C4b 可以和细胞膜的结合点（或抗体）结合。但是，只有少量 C4b 分子有机会和细胞表面牢固结合，其余大多数分子留在溶液内，迅速失去结合能力而蜕化成无活力的 $(C4b)_i$。此反应过程可用下式表示：

$$EAC\bar{1} \xrightarrow{C4 \curvearrowright C4a + (C4b)_i} EAC\overline{1,4b}$$

$C\bar{1}$ 酶还将 C2 切成两个片段：C2a（分子量约为 85,000）和 C2b。当有 Mg^{++} 存在时，C2a 与固定在膜上的 C4b 结合，形成有肽酶活力的 $C\overline{4b,2a}$ 复合物，称为 C3 转化酶。C2b 不表现生物活性。未能和膜结合的游离的 C2a，迅速失去活性，蜕化成 $(C2a)_i$。膜上结合的 C2a 也可能被释放出来，蜕变成无活性的。此过程简述如下式：

$$EAC\bar{1},4b \xrightarrow{C2 \curvearrowright C2b + (C2a)_i} \underset{(C3\ 转化酶)}{EAC\overline{1,4b,2a}} \longrightarrow C2a^d + EAC1,4b$$

C3 转化酶的特点是从两个无酶活力的前身物 C2 和 C4 相互作用产生的。C2 或 C4 单独经 $C\bar{1}$ 酯酶作用，都不能产生酶活力。只有当 C4 先经 $C\bar{1}$ 酯酶作用，然后将 C2 加到反应物内，在有 Mg^{++} 存在时，才能出现 C3 转化酶活力。C4 和 C2 的反应顺序不能颠倒，否则就无效。因此，这些结果说明 C4 在 $C\bar{1}$ 作用下转变为 C2 的接受体（acceptor），激活的 C2 再与 C4 结合形成酶复合物。

当 C3 转化酶（$EAC\overline{1,4b,2a}$）形成后，去除 $C\bar{1}$ 不影响以后反应的进行。这时 $EAC\overline{4b,2a}$ 就能将 C3 切成两个片段，C3a 和 C3b（图 12-10）。小片段 C3a（分子量约 7,000）具有过敏毒素和多形核白血球化学吸引活力。少量 C3b（约 10%）和 $EAC\overline{4b,2a}$，或附近的膜结合点结合，而其余游离的 C3b 迅速变为 $(C3b)_i$。此过程简述如下式：

$$EAC\overline{1,4b,2a} \xrightarrow{C3 \curvearrowright C3a + (C3b)_i} EAC\overline{1,4b,2a,3b}$$

其中 $C\overline{4b,2a,3b}$ 可能相当于依赖 C3 的肽酶，也称为 C5 转化酶。

3. 攻击单位在膜上的形成

（1）$C\overline{5,6,7}$ *反应*

C5 转化酶（$C\overline{4,2,3}$）和 C5 分子反应，产生两个片段，C5a（分子量为 10,000）和 C5b（分子量为 170,000）。大片段 C5b 和细胞膜结合，成为后面几个补体成分相继作用的地点：

$$C\overline{4,2,3} \xrightarrow{C5 \curvearrowright C5a} C\overline{4,2,3,5b}$$

C5a 也是一种过敏毒素，其作用专一性和 C3a 不同。C5a 也有吸引多形核白血球（主要为嗜中性球）的能力。

C6，C7 与膜上的 C5 起反应的方式还不太清楚。有人认为 C5，C6，C7 可能在血清中形成一个三分子复合物 C5,6,7 作为一个功能单位和膜结合（Polly 和 Müller-Eberhard，1971；Arroyave 和 Müller-Eberhard，1971）。

C5,6,7 和 EAC$\overline{4,2,3}$ 反应方式如下：

$$EAC\overline{4,2,3} \xrightarrow{C5,6,7 \searrow C5a + C(5,6,7)_i} EAC\overline{4,2,3},5b,6,7$$

此反应产生的三分子复合物 C(5b,6,7) 对白血球有化学吸引力。

（2）C8，C9 反应

当 C(5b,6,7) 复合物形成时，一个 C8 分子便和此复合物结合，随后 6 个 C9 分子又和这一个连接的 C8 结合，结果形成一个由 10 个分子聚集成的大分子集团，分子量达到 100 万。这一复合物在短暂的时间内能和膜结合，嵌入脂双层内，并引起细胞的溶解 (Kolb 和 Müller-Eberhard, 1973)（图 12-15）。引起细胞溶解的免疫损伤地点很可能就是 C5b,6,7 复合物嵌入膜内的地点。

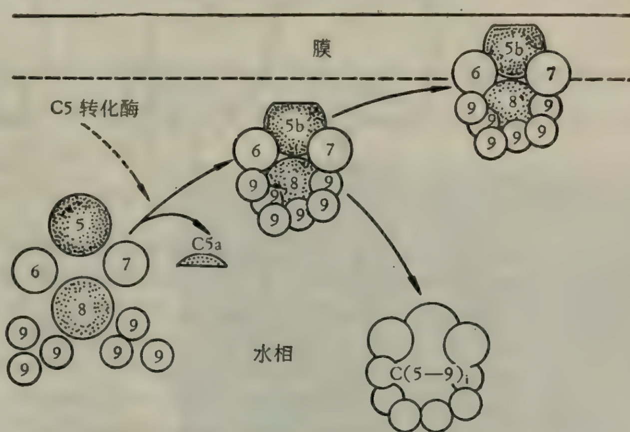


图 12-15　简图示 C(5—9)$_i$ 稳定复合物的形成。C5 激活时，C5b 至 C9 各成分连结成一个牢固的复合物。这一复合物在短暂时间内有和细胞表面结合并引起细胞溶解的能力。当失去和膜的结合点时，在水溶液内仍保持稳定的排列，但失去溶细胞的能力（据 Kolb 和 Müller-Eberhard, 1973）。

细胞受到 C8 作用时，只能发生轻度而持续的溶解。C9 的结合就能够加快和加强这一进程，最后导致细胞膜的破裂和细胞的溶解 (Müller-Eberhard, 1972)。膜的损伤将结合电子显微镜观察结果在下

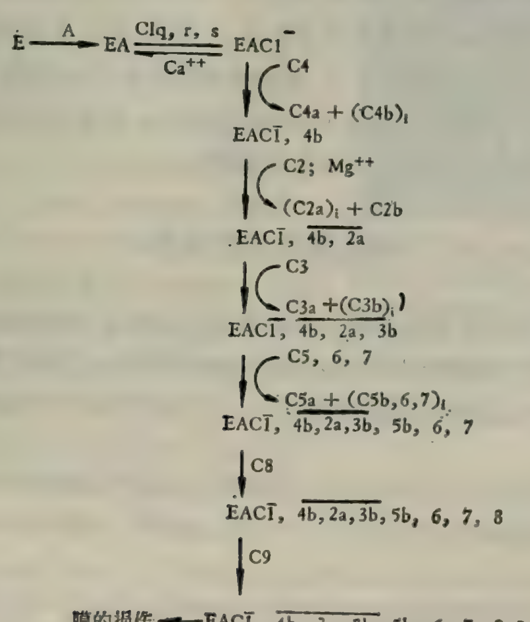


图 12-16　抗体和补体引起细胞膜损伤的初级途径 (Müller-Eberhard, 1969)。

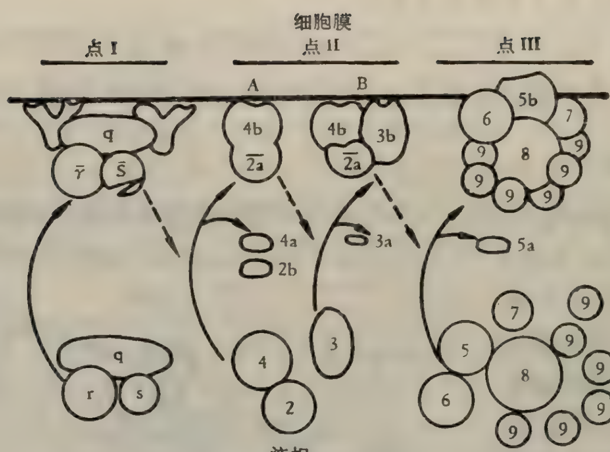


图 12-17 简图示 C1 复合物和其他复合物从液相转移到靶细胞表面的三种结合点模型。C1 复合物通过 C1q 和膜上两个相邻的 IgG 抗体分子结合(点 I)。C1 复合物内亚基间相互作用使 C1s 激活。$\overline{C1s}$ 激活 C2, C4 的不稳定结合点，并形成 $\overline{C4,2}$。$\overline{C4,2}$ (C3 转化酶) 在与点 I 不同的位置和膜结合 (点 II)。$\overline{C4,2}$ 将 C3 裂解,形成 $\overline{C4,2,3}$ (C5 转化酶)，并与膜结合。许多 C3b 片段簇集在 $\overline{C4,2}$ 微环境周围的膜上,它们和免疫粘着有关系。$\overline{C4,2,3}$ 断裂 C5，并形成 C5b-9 复合物，在另一个地点嵌入膜内(点 III)，结果出现可见的膜损伤(Müller-Eberhard, 1975)。

一节讨论。

总结上述补体反应初级途径及副产物,可用图 12-16 表示。

最后,还要提到补体和靶细胞膜结合的地点问题。Müller-Eberhard (1975) 总结上述一系列工作后,认为补体对靶细胞膜起作用的"功能单位"是在激活过程中形成的三个多分子复合物，它们分别和膜上不同的位置结合(图 12-17)。首先，C1 复合物通过 C1q 和膜上两个相邻的 IgG 抗体分子结合 (点 I)。通过 C1 复合物亚基间的相互作用,在该处激活的 $\overline{C1s}$ 酶催化形成的 $\overline{C4,2}$ 复合物又和膜上另一位置(点 II) 结合，并在此处转化为 $\overline{C4,2,3}$。后者再发动形成 C5b-9 复合物。新生的 C5b-9 复合物再转移到膜上另一位置(点 III)，嵌入膜内,并转变为膜损伤。

(三) 细胞膜的免疫损伤

Mayer (1961) 根据对免疫溶血作用的动力学分析的结果,提出溶血作用是红血球膜上局部损伤的结果,一处损伤就足以引起细胞的溶解;膜的一处损伤又是由于补体分子的一次"碰撞"造成的*，而不是一个累积的过程。这就是所谓"一次碰撞"理论 ("One hit" theory)。

Green 等(1959)对红血球、Krebs 腹水瘤细胞的免疫溶细胞作用的研究,观察到细胞内小分子 (K^+，游离氨基酸等)和大分子(蛋白质、核酸等)的漏失现象。如细胞膜外加

---

* 最初曾认为一个补体分子或一个特定补体成分的分子负责一次碰撞。然而，不久就弄清楚了这对于许多补体成分说来是不正确的。于是，便改用"功能分子"的概念来代表动力学分析上与一次碰撞有关的补体成分或复合物。如前述 C5b-9 多分子复合物很可能代表这样一次碰撞,并负责造成一个损伤。

足够浓度的 BSA 时，蛋白质的漏失便被阻止了，而细胞膜维持离子主动运送的能力（保持 K^+，排出 Na^+）仍不能恢复。因此，假定补体引起的溶细胞作用始于膜上功能性"小洞"的形成，使小分子自由漏失，渗透压不平衡，结果细胞因吸水膨涨而破裂。Dourmashkin 和 Humphrey (1963) 最先用电子显微镜观察到，红血球受到免疫损伤时能产生典型的孔洞。这为"一次碰撞"理论提供了从形态学上验证的依据。此后，他们对孔洞的形态、性质和产生的机制等方面作了系统的研究（Humphrey 和 Dourmashkin, 1969）。

1. 亚显微形态特征

羊红血球受家兔抗 Forssman 抗体和豚鼠补体作用而溶血时，电子显微镜观察发现经过反染色的损伤的膜上呈现典型的孔洞。孔洞直径约为 80—100 Å，通常呈圆形、深色的洞穴，周沿有一圈亮的环。这些孔洞在膜上的分布不规则(图 12-18)。各类抗体（IgM, IgG）和各种动物的补体产生的孔洞，形态大小均近似。对于未固定的膜，人补体造成的孔洞（100—110 Å）和豚鼠补体造成的孔洞(85—95 Å)，大小仅略有差异。和其他各种溶血剂，如皂素、链球菌溶血素（Streptolysin O)、溶血卵磷酯等造成的孔洞比较，无论大小、形状和排列方式都和补体造成的孔洞有明显的区别。除红血球外，补体对其他的细胞和病毒也能引起类似的膜损伤。



图 12-18 羊红血球膜被 Forssman 抗体和豚鼠补体溶解的电子显微镜观察。(a) 膜的一部分，表面有大量孔洞，每一孔洞周沿有一圈亮的环(×200,000倍)。(b) 一个孔洞的放大，孔洞周沿的一圈亮环被许多突起围绕(×780,000 倍)(据 Humphrey和Dourmashkin, 1965)。

(1) 哺乳类有核细胞

小鼠 Krebs 腹水瘤细胞经家兔抗腹水瘤抗体和豚鼠补体处理时，细胞膜上造成形态上类似的孔洞（"C" 孔洞）(Humphrey 和 Dourmashkin, 1965)。大鼠腹腔肥大细胞经家兔抗大鼠肥大细胞抗体和补体处理时，也造成典型的"C" 孔洞，并释放出组织胺。这种依赖补体的组织胺释放和过敏反应所引起的是不同的。如大鼠对卵白蛋白过敏时，肥大细胞和抗原接触时，细胞膜不产生孔洞，但出现直径约 250 Å 的球状突起。此外，IgE 抗体引起的组织胺释放机制也不同，不能被酯酶抑制剂抑制（Humphrey, 1968）。

(2) 细菌

革兰氏阴性细菌可被抗 O-胞体抗原抗体和补体杀死，并产生典型的"C"孔洞。Glynn 和 Milne (1967) 发现当溶菌酶被抗溶菌酶抗体抑制时，不影响大肠杆菌膜上"C" 孔洞的形成，但是溶菌作用被显著地推迟。如果再加入卵清溶菌酶时，溶菌作用又加

速。因此，免疫损伤是由抗体和补体引起的。溶菌酶只能加速细菌的杀死和溶解，但不影响孔洞的形状。

(3) 病毒颗粒

鸡传染性气管炎病毒经未加热的家兔抗血清处理时，病毒包膜产生典型的"C" 孔洞(100 Å)，而加热后便不产生。此外，激活的补体还能溶解 AKR 白血病病毒和其它 C 型 RNA 病毒 (Qroszlan 和 Gilden, 1970)。这些病毒成熟时，从寄主细胞表面出芽释放出来，并在这过程中包上一层酯蛋白膜。后者显然对补体系统敏感。顺便提到，其他病毒如 T 族大肠杆菌噬菌体，缺少补体攻击的底物。然而，它们的感染力不能被抗体中和，却能被补体中和。并且这种作用只需要补体系统的前几个成分把病毒包盖起来。

(4) 细菌脂多糖膜

用大肠杆菌 (*E. coli* 12408) 脂多糖做成的膜，用正常豚鼠血清(含天然抗体和补体)处理，能产生典型的"C" 孔洞。补体激活被抑制时，就不能产生孔洞了。

总之，从红血球、有核细胞到人工脂多糖膜，补体都能造成典型的孔洞。

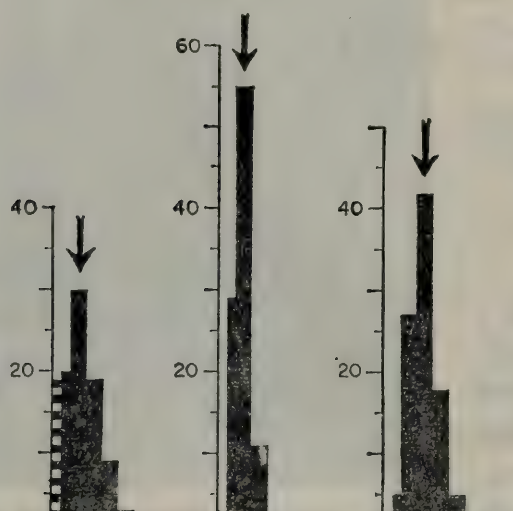


图 12-19 家兔 IgM 抗 Forssman 抗体对羊红血球膜产生的孔洞。一个孔洞代表一个免疫损伤点的证据：2×10^8 羊红血球和不同量的纯化 IgM Forssman 抗体和过量豚鼠补体(1/20)温育一小时(37℃)。然后，离心收集膜的碎片，经反染后，电子显微镜观察，测量单位面积内孔洞数目。确定引起50%溶血所需 IgM 抗体的量，并根据"一次碰撞"理论推算出这一数量的抗体足以引起平均每个细胞 1.4 损伤。假设 1) 一个附着的 IgM 抗体分子足够激活补体引起一次损伤，2) 一个孔洞代表一处损伤。箭头所指示的预期每μ^2膜内孔洞的数目和实际观测的数目是一致的 (横格长方块——没有孔洞的照片；黑长方块——每平方微米有数字所示的孔洞数目的照片)(据 Humphrey 和 Dourmashkin, 1969)。

2. 膜损伤的分子机制

(1) "C" 孔洞和膜免疫损伤的关联

电子显微镜观察到的膜孔洞是否能真正代表膜的免疫损伤。有许多证据表明，孔洞的产生和补体引起的免疫损伤之间的关联是肯定无疑的。这些证据是：

1) 所有免疫损伤的细胞(人、羊红血球，Krebs 腹水瘤细胞，大鼠肥大细胞，格兰氏阴性细菌)膜上都有典型的孔洞，和其他溶血方法造成的孔洞形态上有显著不同；

2) 当补体溶细胞作用不完全时，未溶解的细胞再用低渗压处理使其破裂，结果细胞膜碎片上并没有孔洞。未激活的补体，单独抗体或补体也不能造成孔洞；

3) 孔洞能代表真正的免疫损伤的最重要的证据是 Borsos 等 (1964) 的实验。在家兔 IgM 抗 Forssman 抗体、羊红血球和豚鼠补体系统中，先测量出在补体过剩的标准条件下，引起 50% 溶血所需的 IgM 抗体量。假定每一个

溶血损伤相当于一个孔洞，按照 Poisson 分布，在抗体量足够引起 50% 溶血时，每一个裂解的细胞平均应有 1.4 个损伤。然后，在相同的标准条件下，用上述经确定的 IgM 抗体浓度的不同倍数来处理红血球，并用电子显微镜观察免疫损伤的红血球膜碎片，计数相当于一个红血球全部细胞膜面积（$26\mu^2$）上孔洞的数目。结果发现实际观察到的数目和根据“一次碰撞”理论作动力学计算预期的损伤点数是颇为一致的（图 12-19）。因此，这些实验表明在这一系统中，一个孔洞可能代表一个有效的足以使细胞溶解的免疫损伤。这是符合“一次碰撞”理论的。

但是，在另一实验系统中（羊红血球，家兔 IgG 抗 Forssman 抗体和豚鼠补体），当补体过量而 IgG 抗体的量有限制时，实际观察到的孔洞数目和据“一次碰撞”理论预计的数目不一致，实际观察数目偏高。也就是说，红血球膜上一损伤点可能出现一群孔洞（Humphrey 和 Dourmashkin, 1969）。这一现象可能使补体作用放大，更有效地杀伤细胞。

此外，对于某些实验系统（羊红血球，家兔抗 Forssman IgM 抗体和人补体）也观察到免疫损伤造成的孔洞的实际观测数目和“一次碰撞”理论的符合程度是有条件的。当抗体的量有限制而补体过量时，膜上一次损伤可产生一群孔洞。反之，当溶细胞作用受到补体浓度限制时，就不出现一群孔洞。观测到的膜孔洞数目和按“一次碰撞”理论推测的数目相接近。

（2）造成一次免疫损伤（一个孔洞）所需的抗体分子数目

先利用纯化的 ^{125}I 标记的家兔抗羊红血球 Forssman 抗体（IgM 和 IgG）测量每一个红血球表面抗体结合点的最大数目。结果发现 IgM 结合点约为 90,000，IgG 约为 600,000。假定结合点的性质相同，则一个 IgM 分子（具有 5 或 10 抗原结合位点）应相当于 5 个 IgG 分子（假定在抗体极端过量时 IgG 通过一个抗原结合位点和膜抗原结合）然后，可以用两种方法推算造成一个孔洞所需的抗体分子的数目。一种方法是测量在有过量补体存在时，引起羊红血球 50% 溶血所需的标记抗体分子数量。假定每个溶解细胞至少有一个孔洞，完好的细胞没有孔洞。于是，按“一次碰撞”理论推算 50% 溶血时，每细胞平均孔洞数应为 1.4。由此可推算出产生一个孔洞所需的抗体量。另一种方法，用较大的已知量的标记抗体和过量标记补体处理羊红血球，借电子显微镜观察膜碎片上孔洞的数目。再由此算出产生一个孔洞所需的抗体量。两种方法估计的结果列于表 12-4 和表 12-5。

表 12-4 造成一个孔洞所需 IgM 抗体分子数目的估计

	限制稀释法		电子显微镜直接观察法		
	50%溶血时，抗体分子数/细胞	抗体分子数/孔洞	加入抗体分子数/细胞	观察到的孔洞数/细胞	抗体分子数/孔洞
IgM	4.2	3.6	200	102	2 }3
	6		34	8.2	4.1
IgM（高度纯化）	3.8				
	3.5 }	2.4	71	21	3.4 }
	3.0 }		34	14	1.7 }2.1
	3.25 }		60	52	1.15 }

表 12-5 造成一个孔洞所需 IgG 抗体分子数目的估计

	限制稀释法		电子显微镜直接观察法		
	50%溶血时抗体分子数/细胞	抗体分子数/孔洞	加入抗体分子数/细胞	观察到的孔洞数/细胞	抗体分子数/孔洞
IgG (高度纯化)	2,800	2,200	69,000	225	308
	2,500				
IgG (高度纯化)	9,000	6,200	510,000	211	4,100
	8,500		206,000	213	960

从上表可以看出，2—3 个 IgM 抗体分子就能产生一个孔洞，而 IgG 需要比 IgM 多 100—1000 倍数目的分子才能产生一个孔洞。如前所述，据估计每个红血球表面 IgM 抗体结合点总数约为 90,000。因此必须设想一个 IgM 抗体分子和膜上一个结合点附着就能引起一个孔洞，因为很难设想 2—3 个 IgM 分子在 90,000 个结合位置中，如何能有机会同时到达一个结合点。同样地，据估计 IgG 抗体在一个红血球表面总共约有 600,000 结合点，那么至少要有 800 个 IgG 抗体分子随机地附着，才能得到两个分子相邻的机会。如果假定在此实验条件下补体效率为 1/2.5，则前一数值可换算为 1,950，即 1950 IgG 分子/孔洞。这和实际观测的数目相差不远。因此，可以假定对 IgG 抗体需要两个分子附着在膜上相邻的位置才能激活补体造成一次免疫损伤(一个孔洞)，而 IgM 则只需一个分子就能造成一个孔洞。这或许可以解释 IgM 抗体分子的溶血效率为什么比 IgG 高很多了 (Humphrey 和 Dourmashkin, 1965)。

(3) 孔洞形成的时期

现已证明膜的免疫损伤是从 EAC1,4,2,3,5 期开始的。将补体各成分陆续加到被抗体致敏的红血球时，发现当 C5 和膜结合后，细胞膜上便开始出现可见的亚显微形态的损伤(典型的孔洞)；并且当继续加 C6—C9 时，每一细胞上已出现的孔洞数目不再增多(表 12-6)。如果用胰蛋白酶去除和膜结合的 C5 以后，膜损伤仍能继续存在。这表明一当膜损伤发生后，就不再需要 C5 的存在 (Polley 等, 1971)。至于 C5 对膜损伤的作用方式目前还不清楚。有人假定激活的 C5 可能相当于一种表面活性剂，和膜的脂双层

表 12-6 红血球-补体复合物之亚显微损伤

复合物	每一细胞上损伤数目
EA	0
EAC 1,4	0
EAC 1,4,2	0
EAC 1,4,2,3	0
EAC 1,4,2,3,5	1705
EAC 1,4,2,3,5,6	1120
EAC 1,4,2,3,5,6,7	1060
EAC 1,4,2,3,5,6,7,8	1680
EAC 1,4,2,3,5,6,7,8,9	1509

(据 Polley 等,1971)。

发生疏水性相互作用，造成膜的形态变化。

（4）孔洞的化学性质

Humphrey 和 Dourmashkin (1969) 对细胞膜“C”孔洞的性质作过初步分析。当“C”孔洞在膜上出现后不久，用胰蛋白酶或 pH2.5 处理，使抗体或补体成分脱离，这时孔洞的外形不但没有变化，反而轮廓更加清楚。反之，用有机溶剂处理，则全部消失。因此，推测膜上的孔洞应位于脂双层，并假定孔洞的产生可能是由于脂双层的重排列，由小的胶束形成的环形构造。

Mayer (1973) 根据细胞膜的流动镶嵌模型(参看第四章，114 页)，进一步提出“C”孔洞构造和形成机制的假说，即“圈饼”模型（“Doughnut” model）（图 12-20）。他假定补体的后几个成分，C5—C9，是两侧异性蛋白质，它们能穿过整个细胞膜的脂双层，互相连结成一个“圈饼”形的构造。“圈饼”外壁是由蛋白质分子的疏水性侧链构成的，亲水性侧链则朝内，从而形成一个稳定的沟通细胞内外供水和离子进出的通道。由于渗透压不平衡，水不断进入细胞，终于造成细胞的破裂。如前节所述，C5—9 复合物的分子量达到 10^6，足以形成一个直径 100 Å 的孔道。其次，这种孔洞能被脂溶剂破坏，而不能被蛋白酶去除的上述观察，也可以作这样的解释：假定孔洞穿过整个脂双层，当蛋白质构造被去除后，留下来的孔洞仍可能相当完整地保存下来。

这一假说后来得到一些电子显微镜观察结果的支持。有人用冰冻蚀刻法观察羊红血球细胞膜，发现当用抗体和补体处理时，脂双层的内层有“圈饼”样的蛋白质聚集，单用抗体处理则没有 (Seeman 等，1973)（图 12-21）。电子显微镜观察脂微体膜受到的补体

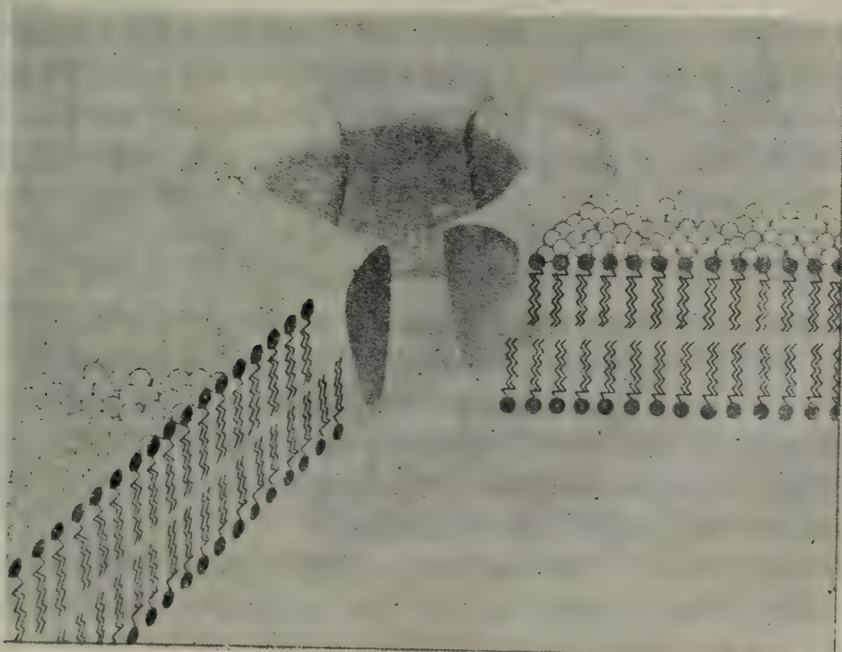


图 12-20 “C”孔洞的构造——“圈饼”模型。补体的后几个成分 C5，C6，C7，C8 和 C9 穿过膜的脂双层，连结成一个环形的孔道。由于渗透压不平衡，水和离子不断地通过这一孔洞进入细胞而使细胞破裂(据 Mayer, 1973)。

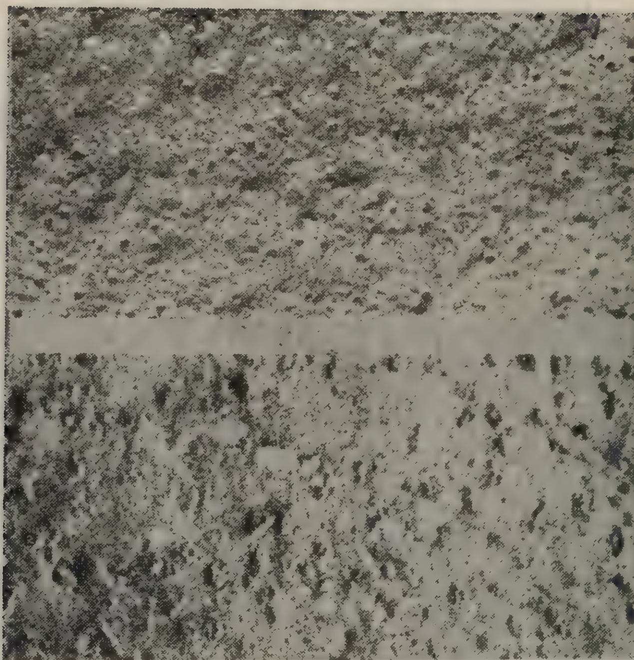


图 12-21 羊红血球细胞膜之冰冻蚀刻观察，上图：单用兔抗羊红血球抗体处理之羊红血球膜脂双层剥离的内层表面。正常存在的球蛋白颗粒(9 毫微米)没有变化。×210,000 倍。 下图：经兔抗体和补体溶血的羊红血球细胞膜剥离的内层表面。"圈饼"状损伤似乎贯穿脂双层。×210,000 倍(据 Seeman 等,1973)。

损伤,发现存在穿过脂层的漏斗形构造（Lachman 等，1973）（图 12-22）。尤其有趣的是,有时还可以看到一些脱离脂膜表面的、游离的环形构造,似乎像是由补体蛋白组成的。这种解释是否属实,还有待于鉴定其上是否确有补体成分的存在。近来用 ^{125}I 标记和膜结合的 C5b,6,7 复合物,再用胰蛋白酶消化的实验,提示 C5b,6,7 复合物的 C5b 和 C7 亚基的疏水性侧链可能先嵌入脂双层,然后再和 C8，C9 反应，形成穿过膜层的孔道（Hammer 等，1975）。

（5）细胞膜免疫损伤的生物学意义

补体作为辅助抗原抗体反应的效应分子,起着扩大免疫反应并使之更为有效的作用。如一个 IgM 抗体分子和细胞表面抗原结合，在有补体参加时，就足以杀死一个靶细胞。这一过程中,专一抗体分子起着识别靶细胞的作用,再由补体扩大影响,完成对靶细胞的杀伤。这对于抗体对抗细菌、病毒感染和肿瘤免疫等防御机制的重要意义是显而易见的。另一方面,抗原抗体复合物和补体的相互作用又可造成正常组织的免疫损伤。因此,补体溶细胞作用在正常和病理生物学方面都是很重要的。

免疫溶细胞作用的效率和靶细胞表面抗原决定簇的排列方式有密切的关系。当靶细胞表面抗原决定簇呈规则的紧密排列时，一个 IgM 抗体分子和细胞表面抗原呈多价结合,或者两个 IgG 抗体分子能同时相邻地附着到细胞表面上的机会也就增多，免疫损伤因而也较易发生。红血球表面的 Forssman 抗原和格兰氏阴性细菌表面的"O"抗原的排列结构都能满足这种要求。另一方面,有人设想肿瘤细胞在癌变过程中,表面抗原结构

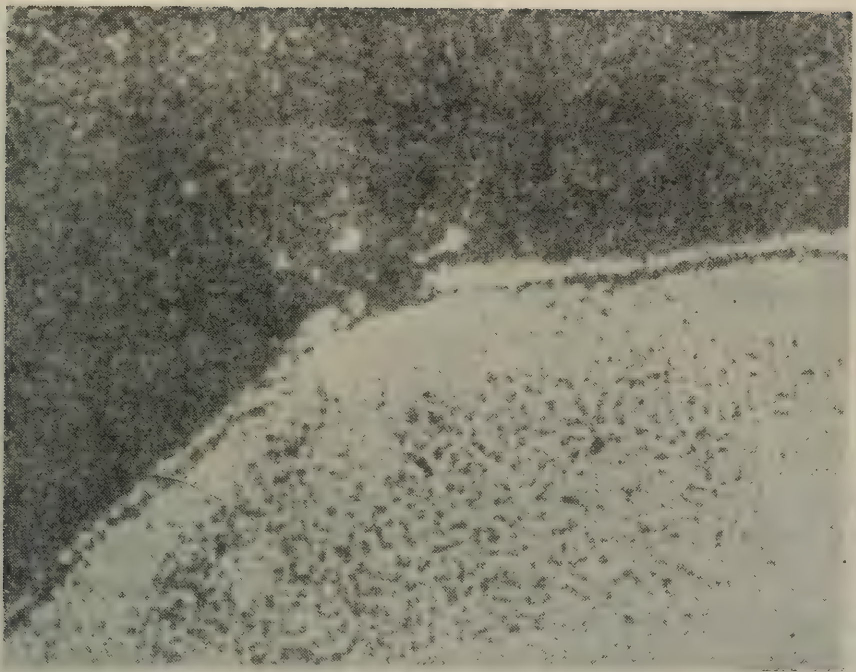


图 12-22 卵磷脂制备的脂微体膜(10 或 11 毫微米)上，补体造成的漏斗形的损伤(据 Lachman 等，1973)。

或排列发生变化，不能满足补体有效作用所需的条件，因而可能逃脱体液抗体的杀伤作用。

补体激活只有发生在细胞表面上或非常接近表面的地方，才能产生溶细胞作用。例如将细菌的“O”抗原(脂多糖)附着到羊红血球膜上，再用抗体和补体处理时，很容易产生免疫损伤。但是，将肺炎球菌 3 型荚膜多糖 (S_3) 附着到红血球膜上，只有用过量的抗 S_3 抗体远超过血凝反应或补定固定的需要量才能引起溶血。电子显微镜观察发现，多糖在红血球表面堆集成不均匀的团块不贴近表面。虽有广泛的补体固定，但很少能贴近细胞表面产生效果。也就是说，补体只能在非常靠近细胞表面的距离才有效。这是由于激活的补体成分半衰期很短促的缘故。由于这种特性就大大减少了激活的补体对细胞的非专一损伤的可能性。

已知某些类别的抗体 (IgE, IgD 等) 不能激活补体。能激活补体的抗体的效率也有所不同。IgM 抗体分子的溶细胞效率比 IgG 高许多倍。IgM 和 IgG 的这种差异，也许说明了在免疫过程早期暂时出现的，亲合力低的 IgM 分子，为什么在进化过程中能保存下来的原因。对格兰氏阴性细菌，溶菌酶能加强抗体和补体的作用。整个机制似乎适应于充分利用亲合力低的“天然” IgM 抗体，以及在初级免疫反应早期产生的 IgM 抗体。这也可能是 IgM 能不被淘汰的另一个原因。

四、和补体有关的免疫学现象

近年来发现补体的生物学作用不限于溶细胞作用。补体激活过程中产生的中间复

合物和片段，几乎都具有重要的生物活力。补体之中间复合物和片段的生物活力列于表12-7：

表 12-7 补体成分和产物的生物学活力

补体复合物	成分的片段	功能
C1,4		免疫共凝聚作用
C1,4,2,3		附着白血球 共凝聚作用 释放组织胺 免疫粘着作用 免疫共凝聚作用
		调理作用
	C3a	过敏毒素 化学吸引素
	C5a	过敏毒素 化学吸引素
C1,4,2,3,5,6		Arthus 反应 释放组织胺
	C(567)a	化学吸引素
C1,4,2,3,5,6,7,8		缓慢溶血 溶血
C1,4,2,3,5,6,7,8,9		溶细菌作用 溶病毒作用

（据 Ingram 和 Quinn，1972)。

从上表可见，免疫学中许多具有重要的病理生物学意义的现象是和补体或其产物有关的。这些现象包括吞噬细胞的化学吸引、免疫粘着、共凝聚作用和免疫共凝聚作用、过敏反应和灭菌素（Properdin）等（Schultz，1971)。近来还发现 C6 和凝血机制有关系。现分述如下：

（一）多形核白血球的化学吸引

多形核白血球被吸引、向局部集中是炎症反应的先决条件。豚鼠和家兔的血清和免疫复合物或细菌内毒素作用时，产生一种低分子量的、耐热的多形核白血球化学吸引因素，经证明为 C5a 片段。人类嗜中性球至少对三种补体复合物或产物（C5,6,7，C3a 和 C5a）起化学吸引反应，而发生定向的移动。化学吸引因素的作用可能是通过细胞膜上酯酶的激活（Ward，1972)。

近来还有人从大鼠血清中分离出过敏毒素和与其有关的一种多肽，称为助细胞吸引素（Cocytotaxin)。后者是一种碱性多肽(分子量为 8,500)，本身并没有过敏毒素活性，单独存在时也不表现出什么中性球化学吸引活性。然而，当把它和过敏毒素混合时，便表现出明显的对中性球的化学吸引作用。因此，中性球的化学吸引是两种多肽共同作

用的结果（Wissler, 1972; Wissler 等, 1972）。

豚鼠的两种 IgG 抗体 （γ1 和 γ2），因其免疫复合物固定补体能力不同，引起的免疫反应也不同。γ2 抗体和抗原结合后能固定补体，产生白血球化学吸引素，招致大量多形核白血球聚集到免疫复合物沉积的地方，造成局部的炎症和坏死，出现所谓的 Arthus 反应。γ1 抗体的免疫复合物不能固定补体，结果只产生被动皮肤过敏反应（PCA）。Keller 等（1968）发现 γ2 抗体的免疫复合物和正常豚鼠血清保温时，产生的白血球化学吸引力比 γ1 引起的高三倍。这一实验也支持上述解释。这些结果表明，因免疫球蛋白固定补体能力不同而影响其产生的白血球化学吸引活力，最终反映在整体水平的免疫反应便有显著的不同。

（二）免疫粘着现象

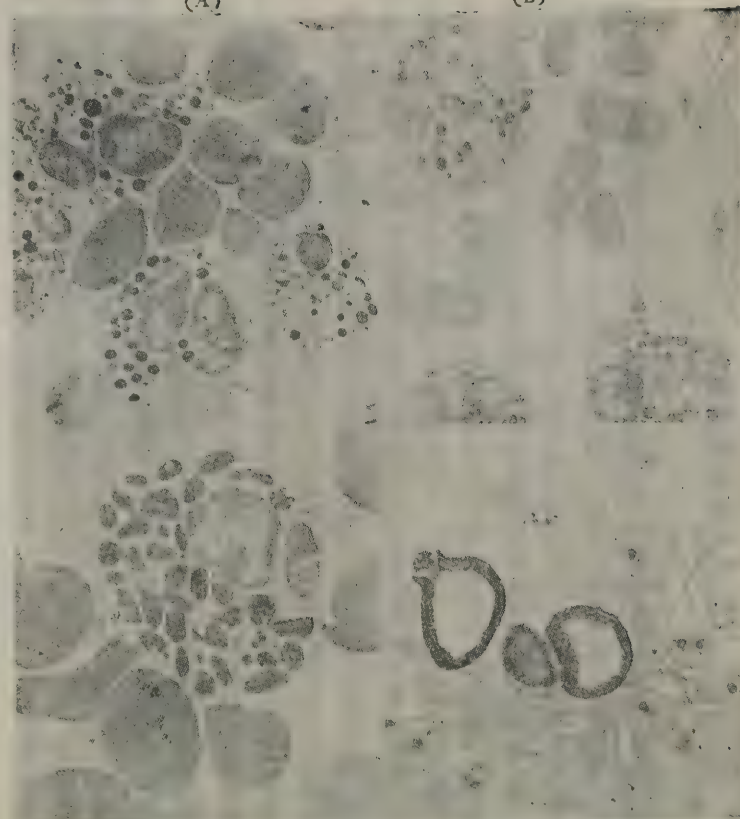
免疫粘着现象（Immuno-adherence）最初是指抗原-抗体-补体复合物粘着到灵长类未致敏的红血球上的现象（Nelson, 1953）。颗粒抗原的免疫复合物在有新鲜血清存在时，便被粘附到红血球表面，然后一同被白血球吞噬。此过程需要补体 C1—C4，尤其是 C3 的参加。近年来发现这一现象在抵抗感染和其他免疫病理学效应中有重要意义。抗体对抗原的识别而形成的免疫复合物，在有补体参加时，又能被许多细胞（包括嗜中性球、嗜酸性球、单核球、血小板、红血球、淋巴球以及网状内皮系统的细胞）识别，而被粘附到这些细胞的表面，进而激发细胞的吞噬活动或释放出种种生物活性物质，引起它们对抗原（微生物或细胞等）的吞噬或破坏（图 12-23）。后来的研究发现这些细胞对抗原-抗体-补体复合物的识别是由于它们的表面存在 C3b 受体（McConnell 和 Lachman, 1977）。

嗜中性球、单核球（巨噬细胞）和抗原-抗体-补体复合物粘着的最重要结果是诱发对免疫复合物的吞噬活动，结果抗原（微生物、细胞等）被吞噬胞内释放的酶消化。颗粒抗原和白血球之间的免疫粘着是它们被吞噬的先决条件。

然而，免疫粘着和吞噬活动又是彼此独立的过程，可被一些抑制因素，如 DFP、碘醋酸等区别开来，即只发生免疫粘着而没有吞噬活动。当嗜中性球和一个面积庞大的免疫复合物，如大片基膜接触时，虽不能吞噬它，但仍能释放出各种溶酶体酶（包括胶原酶、弹性纤维酶、中性和酸性蛋白酶以及增加血管通透性的物质）去消化它。因此，免疫粘着反应本身可能起发动白血球吞噬活动和酶的释放的作用。另一方面，抗原抗体复合物或吸附在酵母多糖（Zymosan）上的 C3 和血小板粘着时，就能激发血小板释放出内含物，如组织胺、5-羟色胺等，引起各种病理生物学效应。

由上述可见，免疫粘着现象在一些免疫性疾病和自身免疫病的发病机制中可能起重要作用。例如，肾小球肾炎中，免疫复合物（抗体、补体）和肾小球基膜结合，吸引嗜中性球粘着到基膜表面，并释放出各种酶破坏基膜，造成肾小球的损伤。家兔实验急性免疫复合物病中，免疫复合物沉积在血管内弹性层和基膜上，结果嗜中性球也附着到这些表面，造成血管内弹性层的破坏和内部的坏死。总之，免疫复合物固定补体是造成组织损伤的第一步，由此诱发的补体反应的产物，吸引多形核白血球到这里，而固定的 C3 又使这些细胞粘着于局部并释放出酶和其他生物活性物质，造成组织损伤或其他病变（Henson, 1972）。

(A) (B)



(C) (D)

图 12-23 依赖补体的细胞粘着现象。(A) 家兔嗜中性球对致敏红血球和补体结合物 (EAC) 的免疫粘着 (×3,730)。(B) 对照。家兔嗜中性球和无补体结合的致敏红血球 (EA) 不发生粘着现象 (4,300)。 (C) 家兔嗜酸性球对 EAC 的粘着 (×5920)。(D) 家兔血小板对酵母多糖 (Zymosan) 固定的补体 (ZC) 的粘着(×6090)(据 D. G. Ingram, 1972)。

（三）共凝集作用和免疫共凝集作用

红血球或细菌等颗粒抗原，当有某些抗体或类似抗体的反应物存在并结合补体时，发生的凝集现象。参与这类现象的有两类反应物：共凝集素（Conglutinin）和免疫共凝集素（Immunoconglutinin）。相应的凝集现象称为共凝集作用（Conglutination）和免疫共凝集作用（Immunoconglutination）。

共凝集素是牛血清内天然存在的一种和免疫球蛋白无关的血清蛋白质（β-球蛋白），它能和被固定的补体（C3b）结合，而引起颗粒抗原的凝集现象，其生物学意义还不清楚。

免疫共凝集素是一种自身抗体，能和被固定的补体的决定簇起反应。在大多数哺乳类正常血清中均有低效价的免疫共凝集素存在，尤其在急性感染的晚期和康复期较为显著。免疫共凝集素的生物学意义还不甚清楚。目前知道免疫共凝集素能加强补体的活力，增强抵抗感染的能力、血清的杀菌能力和吞噬作用。但是，免疫共凝集素对微生物并没有专一的作用，它本身也不是微生物的抑制物，其活力依赖补体，可能是通过加强补体的效应而起作用的（Ingram，1972；Lachman 等，1972）。

（四）过敏毒素

正常豚鼠血清在加入抗原和相应的抗体后能产生毒性物质。除去免疫复合物外，高岭土、硫酸钡、琼脂、酵母多糖和眼镜蛇蛇毒等也能使正常血清产生这种物质。早期研究者曾认为这种毒性物质就是引起过敏性休克的主要原因，因此称为过敏毒素（Anaphylatoxin）（Freideberger，1910）。经典的过敏毒素表现下述生物学活性：

1）引起平滑肌标本（豚鼠廻肠）收缩。当用同一种过敏毒素重复刺激时，对刺激不再起反应，即发生脱敏现象（Tachyphalaxis）。脱敏作用的专一性是确定过敏毒素之功能专一性的最有效的方法。如果一个因素引起脱敏状态后，改换另一因素刺激时仍然不起反应，称为交叉脱敏现象（Cross-Tachyphylaxis）。交叉脱敏表明它们的作用方式和受体有相似的地方。

2）增加血管（微血管后小静脉）的通透性；

3）能使豚鼠组织内肥大细胞释放组织胺，而对大鼠腹腔肥大细胞则无作用；

4）离体和活体条件下，均能吸引多形核白血球；

5）整体血管内注射引起依赖剂量的组织胺休克和全身性过敏；某些器官血流阻力增加。

Osler 等（1959）发现将免疫复合物加入豚鼠和大鼠血清中，能产生过敏毒素活力，同时血清内"经典的 C3"减少。因此，推测过敏毒素和补体反应有关系。补体成分纯化成功后，发现当 $C\overline{1s}$ 加入到 C4，C2 和 C3 溶液中，在有 Mg^{++} 存在时，能产生过敏毒素活力。进一步的分析证明，$C\overline{1s}$ 作用于 C4 和 C2，形成 C3 转化酶。后者再把 C3 切成 C3a 和 C3b 两个片段。C3a 表现过敏毒素活力和白血球化学吸引活力。不过当用胰蛋白酶长时间处理时，过敏毒素活力消失而化学吸引活力仍然保留下来。由此可见，二者在化学性质上是不同的。除 C3 转化酶外，眼镜蛇蛇毒因子，链激酶激活的纤溶酶和胰

蛋白酶都能分解 C3，产生豚鼠平滑肌收素因素。

如前节所述，现在已经知道，C3 是由 α 和 β 两条肽链构成的。C3 转化酶作用于 α 链，将 C3 分解为两个片段，C3a（分子量约 9,000）和 C3b（分子量约 181,000）(Nilsson 和 Mapes, 1973)。C3a 的 N 端经测定为 Ser，C 端为 Arg。C3b 的 C 端不能测出（Müller-Eberhard, 1972)。已知原 C3 分子的 N 端为 Ser，C 端不能测出。据此推测，C3a 是从原分子靠 N 端一段切下来的(图 12-24)。同时，C3 转化酶能切断包含 Arg 残基的羧基的肽键，此酶的性质是和胰蛋白酶相似的。

纯化的 C3a 是由 77 氨基酸残基组成的一条多肽链，碱性很强。分子的碱性是由于含有相当多的酰胺基团，尤其是靠 C 端 Arg 处碱性残基的密度特别高，C 端 13 个残基中有 6 个为碱性的。C3a 结构的另一个特点是含有大量的 α-螺旋构造（40—45%）(Hugli, 1974)。C3a 能表现过敏毒素的种种生物活性，如引起肥大细胞释放组织胺、平

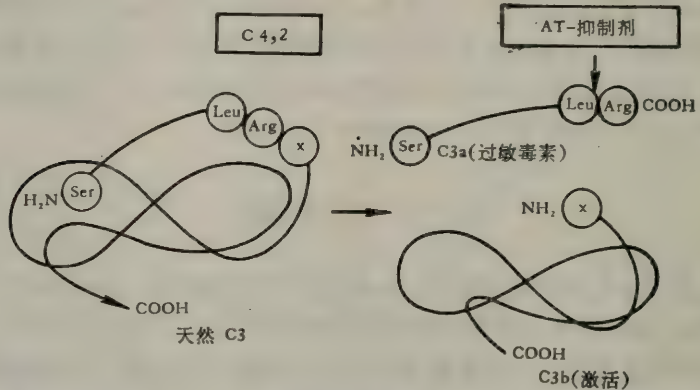


图 12-24 C3a 被 C3a 转化酶激活并释放，以及 C3a 过敏毒素失活的假想图
(图中 AT-抑制剂应为 AT-抑制因子)(据 Müller-Eberhard, 1972)。

滑肌收缩和增加血管通透性等。当注射到人皮肤内，能引起红斑和肿块，只需 2×10^{-12} 克分子剂量就能引起典型反应（Müller-Eberhard, 1972)。此外，还发现 C3a 的生物活性依赖于 C 端 Arg 残基的完整性，此残基被酶切除时，多肽便失去生物活性。作为一种控制机制，人血清中天然存在一个羧肽酶，能将 C3a 的 C 端 Arg 切除，因而能有效地防止人血清在离体条件下产生过敏毒素活性（Bokisch 和 Müller-Eberhard, 1970)。然而，当用免疫吸附法去除此天然的抑制因子，或用 ε-氨基己酸抑制其作用时，人血清就很容易产生过敏毒素活力。此抑制因子经鉴定为一种 α-球蛋白（分子量为 300,000）(Vallota 和 Müller-Eberhard, 1973)。

人和猪的 C3a 的一级结构已见报告(图 12-25)。鉴于 C 端 Arg 残基在功能上的重要性，比较了这两种分子的 C 端排列顺序，发现 C 端 5 个残基(-Leu-Gly-Leu-Ala-$\mathrm{A}^{77}_{\mathrm{rg}}$-COOH）是完全相同的。因此，推想 C 端 5 肽可能和过敏毒素活性有密切的关系(Corbin 和 Hugli, 1976)。

C5 转化酶或胰蛋白酶作用于纯化的 C5 时，也能产生过敏毒素活力（Jensen, 1967)。分离出的有效因子相当于 C5a 片段(分子量约为 15,000)。C5a 同时也表现化学吸引活力。和 C3a 一样，C5a 的结构特点是含有大量的 α-螺旋构造。当用巯基乙醇处理时，α-螺旋构造的特征性圆二色谱和其过敏毒素活力都逐渐降低到一极限值。

NH_2-Ser-Val-Gln-Leu-Met-Glu-Lys-Arg-Met-

10 20
Asn-Lys-Leu-Gly-Gln-Tyr-Ser-Lys-Glu-Leu-Arg-

30
Arg-Cys-Cys-Glu-His-Gly-Met-Arg-Asn-Asn-Pro-

40
Met-Lys-Phe-Ser-Cys-Gln-Arg-Arg-Ala-Gln-Phe-

50
Ile-His-Gln-Gly-Asn-Ala-Cys-Val-Lys-Ala-Phe-

60
Leu-Asn-Cys-Cys-Glu-Tyr-Ile-Ala-Lys-Leu-Arg-

70
Gln-Gln-His-Ser-Arg-Asn-Lys-Pro-Leu-Gly-Leu-

77
Ala-Arg-COOH

图 12-25 猪 C3a 分子的一级结构(据 Corbin 和 Hugli, 1976)。

这说明其生物活性和 α-螺旋结构的完整性可能有密切的关系(Morgan 等, 1974)。

人 C3a 和 C5a 对豚鼠平滑肌没有交叉脱敏反应。这两种因子和豚鼠的过敏毒素也没有交叉脱敏反应。因此,这几种分子可能具有不同的化学结构。进一步研究发现,豚鼠平滑肌对经典的过敏毒素(经琼脂处理的大鼠血清)的连续刺激不起反应(脱敏)以后,对 C5a 片段同样不起反应,而对 C3a 则能起反应。C5a 片段和经典的过敏毒素一样,都不能引起大鼠腹腔肥大细胞释放组织胺,但能使豚鼠肠系膜肥大细胞的颗粒消失。C3a 与此不同,能使大鼠腹腔肥大细胞释放组织胺,而不能使豚鼠肥大细胞的颗粒消失。因此,C5a 的作用更类似经典的过敏毒素,可能代表 Freideberger (1910) 称为"过敏毒素"的物质。

(五) 灭菌素

Pillmer 等(1954)发现一种血清蛋白质能杀死某些细菌、原生动物,并能使一些病毒失活,称之为灭菌素(Properdin)。灭菌素在17°C,当有镁离子和某些不能透析的血清因子存在时,能和酵母多糖相互作用,形成一个复合物。这一复合物能使 C3 分解成 C3a 和 C3b。不能透析的因子包括一个对肼敏感的蛋白质(因子 A)和一个不耐热的蛋白质(因子 B)。后来查明,因子 A 可能就是 C3 或 C3 的较大的片段,类似 C3b,也称为激活的肼敏因子(HSFa)(Goodkofsky 等, 1973)。因子 B 可能相当于一个血清内的酶原(C3 激活原, C3-Proactivator, 简称 C3PA)。C3PA 激活时,分解转化成 C3A。后者能将 C3 分解为 C3a 和 C3b。C3PA 的激活又是由于血清中的一个酶,称为 C3PA 转化酶催化的,它的作用要求 HSFa (C3b) 和镁离子存在。有人认为灭菌素的作用可能是参与 C3PA 转化酶的激活,从而发动补体激活支路,达到溶菌作用(Gotze 等, 1973)。这在下一节还要讲到。

关于灭菌素的化学本质,很长时间不清楚。有人曾认为它是一种抗细菌多糖的"天然"抗体(Nelson, 1958)。相隔十年后,Pensky 等(1968)才从人血清得到纯化的灭菌素,证明是分子量约为 223,000 的蛋白质。它在免疫电泳上位于 β-球蛋白区,和各种已知的免疫球蛋白,补体成分都没有交叉反应。纯化的灭菌素加入到缺少灭菌素的血清中,能够恢复杀菌和溶血作用。因此,灭菌素是一种不同于已知的免疫球蛋白或补体成分

的血清蛋白，能参与人血清的某些免疫反应。最近，同一实验室进一步证明，灭菌素是分子量 184,000±12,000 的糖蛋白。天然的灭菌素分子是一个四聚体，由 4 个大小相同的亚基（分子量＝46,000）以非共价键相连而成。因此，和免疫球蛋白有完全不同的基本结构（Minta 和 Lepow，1974）。

（六）促进凝血

许多能够激活补体的物质，包括菊粉，细菌内毒素、链球菌蛋白 A、Ig 聚集物等，都能通过补体介导途径引起凝血。这些物质能显著地加速正常家兔血凝和血块收缩速度。这种促进凝血活力，需要完整的补体系统存在。遗传上缺少 C6 的家兔，几乎完全失去促进血凝的能力，当加入少量纯化的人的 C6 后，就又恢复正常的促进能力。进一步研究发现，这种家兔所有经典的凝血因子都齐全，无一缺失，并且纯化的 C6 内也不夹杂任何凝血因子。凝胶过滤时，C6 蛋白的溶血活力和促血凝活力也重合在一起。因此，C6 很可能参与促进血凝作用（Zimmerman 等，1971；Zimmerman 和 Müller-Eberhard，1971）。

此外，还有人发现 C2 的片段有类似激肽（Kinin-like Substance）的活力（Lepow，1971）。

总之，补体作为机体防御系统不可缺少的组成部分，可能参与炎症反应的各个环节，包括组织胺的释放、血管通透性增加，吸引白血球以及促进吞噬作用等。补体，一方面通过和抗原抗体系统的连接，扩大抗体的效应功能，而起专一的防御作用；另一方面，各种非专一的损伤刺激，化学的或物理的，都可能通过各种反应支路激活补体系统和引起依赖于补体产物的病理过程，如炎症反应、吞噬活动等，从而起更广泛的非专一的防御作用。这些将在下一节叙述。

五、补体激活支路

除去上述补体激活的经典途径以外，近年来还发现补体成分，特别是 C3 以后的成分，还可能通过其他的支路，即不通过和细胞表面抗原抗体复合物的相互作用，而被某些物质直接激活。这些物质中了解得最清楚的有酵母多糖、菊糖、革兰氏阴性细菌内毒素和眼镜蛇蛇毒因子（CVF）等。它们能固定 C3—C9 补体成分，但相当少地或完全不能固定 C1，C4 和 C2。其中一些物质能诱发 C3 以后的整个补体反应系列，并导致溶细胞作用。

关于补体激活支路的知识主要是通过酵母多糖和眼镜蛇蛇毒因子对血清活力影响两方面独立进行的工作取得的。如前节所述（387 页），Pillemer（1954）首先发现，正常血清中天然存在一种蛋白质成分——灭菌素，在没有专一抗体的条件下，它能和酵母多糖起反应，激活补体系统。灭菌素系统的杀菌作用需要一种肼敏因子（A 因子）和一种不耐热因子（B 因子）以及 Mg^{++} 存在。后来发现 A 因子就是 C3，而 B 因子是 C3 激活原（C3Proactivator，C3PA）。当 B 因子被另一个 D 因子激活时，B 因子的分子就裂解为电泳迁移率不同的两个片段，Ba 和 Bb。因此，后来又把 D 因子称为 C3PA 转

化酶。实际上，B 因子的功能不是通过灭菌素系统的研究，而是通过对眼镜蛇蛇毒因子作用机制的研究才发现的。

Flexner 和 Noguchi (1903) 最先观察到眼镜蛇蛇毒对补体的作用，并且不久就发现蛇毒作用于 C3，而和 C1，C4，及 C2 无关。Müller-Eberhard 和 Fjellstrom (1971) 证明纯化的眼镜蛇蛇毒因子 (CVF) 本身不表现酶活力，并不能分解 C3。为了激活 C3，至少还需要和血清中的一个辅助因子，C3 激活原 (C3PA)（也就是 B 因子）结合形成一个复合物 CVF-B，才能获得酶活力。在 C3PA 转化酶（D 因子）的作用下，CVF-B 复合物才获得 C3 转化酶的活性，能把 C3 裂解为C3a 和 C3b，并导致有溶细胞活性的 C5b-9 复合物的形成。

最近，Müller-Eberhard (1974, 1975) 在总结这两方面工作的基础上，提出一个通过灭菌素起始的补体激活支路的假说。参加补体支路的蛋白质及其和灭菌素系统诸因子的关系列于表 12-8。

表 12-8 参加补体反应支路的蛋白质

蛋白质	相当于灭菌素系统因子	血清浓度（微克/毫升）	沉降常数 (S)	分子量	相对电泳迁移率
起始因子 (IF)		—	7	150,000	γ_1
灭菌素		25	5.4	184,000	γ_2
C3	A因子	1600	9.5	180,000	β_2
C3b		—	9.0	171,000	α_2
C3 激活原 (C3PA)	B因子	200	5—6	93,000	β
C3 激活因子 (C3A)	$\overline{B}$	—	4	63,000	γ
C3 激活原转化酶 ($C3PA_{se}$)	D因子	—	3	24,000	α

（据 Müller-Eberhard, 1975)。

按照这一假说，补体反应支路可看作是两个独立的反应系列，即依赖灭菌素的反应系列和依赖 C3b 的反应系列的复合过程。这两个独立的反应系列都利用 B 因子 (C3PA)，形成一个有 C3 转化酶活力的酶。后者再作用于 C3，产生 C3b，并通过 C3b 正反馈环路而扩大作用。

1. 通过灭菌素的发动

Müller-Eberhard (1974, 1975) 根据其实验室新近的结果，将补体激活支路的分子机制作了一个初步的概括，强调灭菌素系统在补体激活支路的早期事件中起关键作用，并假定各种激活因子都可能通过起始因子，发动灭菌素系统，并通过对 C3 的作用而与补体激活的经典途径相衔接，产生 C3a 和 C5a，以及有溶细胞能力的 C5b-9 复合物。如简图 12-26 左侧所示，血清中的起始因子 (I. F.)，当和各种支路激活因子接触时，便转变为激活形式的起始因子 ($\overline{IF}$)。他还假定后者可能相当于局灶性肾小球肾炎病人血清中的肾炎因子 (Nephritic factor)。不过，起始因子也很可能不只一种。$\overline{IF}$ 能激活灭菌素 (P)。激活的灭菌素 ($\overline{P}$) 又再激活 C3PA 转化酶 (C3PAse)。在天然 C3 和 C3PA 转化酶的相互作用下，C3PA 转化酶表现出裂解 C3PA 的活力。C3PA 裂解的结果，

释放出 C3A。后者在其初生态可以和膜受体结合。结合的 C3A 将 C3 分解成为 C3a 和 C3b 片段。一当有 C3b 产生时，就能发动依赖 C3b 的正反馈机制，而不再依赖先前的灭菌素系统而独立地、继续不断地起作用。

2. C3b 正反馈环路

C3 的支路激活主要是通过 C3b 正反馈环路扩大的结果。C3b，不论它是如何产生的，在有 Mg^{++} 存在时，就能和 B 因子（C3PA）形成一个松散的复合物。这种复合物又能被 D 因子（C3PA 转化酶）裂解形成 $\overline{C3b,Bb}$，即支路 C3 转化酶。后者又能把 C3 裂解成 C3a 和 C3b，从而能推动这一反馈环路周而复始地运转（Müller-Eberhard 和 Götze，1972）（图 12-26，右侧）。于是，通过不断产生的 C3b 和补体激活的经典途径相衔接，形成支路的 C3 转化酶。后者再通过未知的方式转化为支路的 C5 转化酶，再催化形成有溶细胞活力的 C5b-C9 复合物，达到和补体激活经典途径相同的效果。

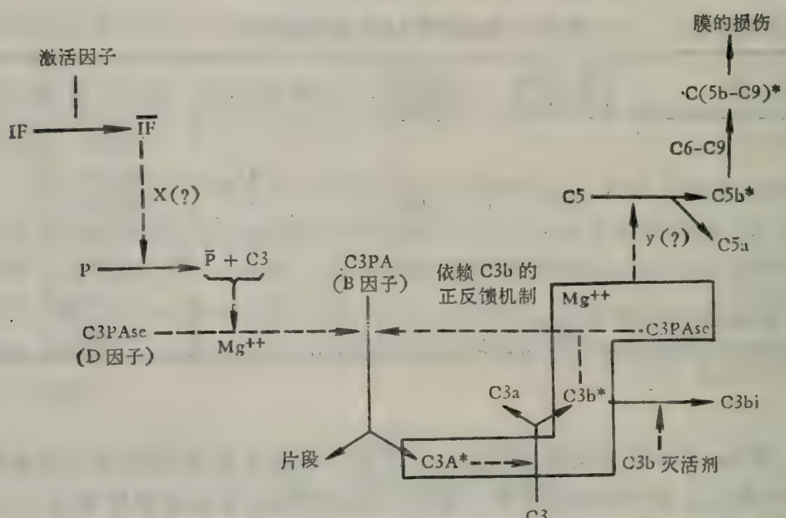


图 12-26 补体激活支路分子机制的新概念。* 酶激活的和膜受体结合的不稳定位点。方框内的几个成分可能和另一个附加因子一起产生 C5 转化酶活力（图中 C3b 灭活剂应为 C3b 灭活因子）（据 Müller-Eberhard, 1974）。

显而易见，这样一种正反馈环路必须有自稳机制调节，否则裂解一个 C3 分子就会导致大量补体激活，造成对机体的危害。机体的这种自稳调节是通过 C3b 的灭活因子（KAF）实现的。KAF 是一种酶，能非常有效地使 C3b 失活，破坏它的触发反馈环路，参加 C5 激活，以及和膜附着等生物活性。现在也已经弄清楚，眼镜蛇蛇毒因子（CVF）实际上就是眼镜蛇的 C3b。它能和哺乳类的 C3b 一样作用于 B 因子（C3PA）。不过，这种 C3b 不能被 KAF 灭活，而是形成一种对 KAF 不敏感的稳定产物 $\overline{CVF,B}$，继续不断地消耗 C3（Lachman 和 Nicol，1973；Alper 和 Balavitch，1976）。

总之，体内外的各种因素，无论是 $\overline{C4,2}$，$\overline{C3b,B}$，$\overline{CVF,B}$ 或者外源酶，只要能把 C3 转化为 C3b 的机制都不可避免地触发这一正反馈环路，导致补体的支路激活。已知细菌的酶和内毒素、蛇毒因子、组织蛋白酶，胰蛋白酶、纤溶酶等都有可能通过支路的不同环节

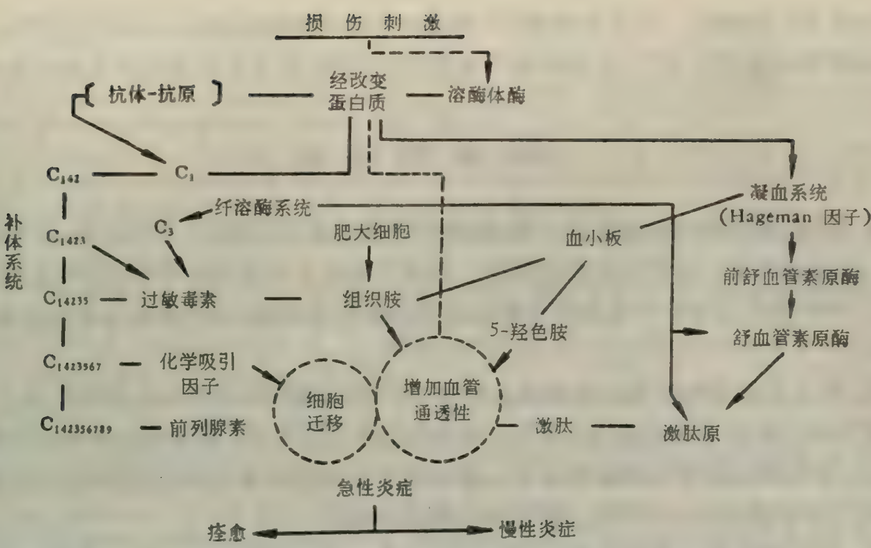


图 12-27 引起炎症反应的多种途径的关系示意图(按 Willoughby, 1970 修改)。

激活补体。机体因组织损伤,外源毒素的侵入以及凝血系统、纤溶酶系统和激肽系统的酶反应,也可能通过支路激活补体系统以及依赖补体产物的,继发的病理生物学过程(Gewurz, 1972)。其结果通常是导致炎症反应。和补体系统有关的,引起炎症反应的多种途径之间的复杂关系,可以用简图 12-27 表示。除此以外,致敏细胞表面产生的某些激活的补体成分(如 $C\overline{5,6,7}$) 可能转移到附近未致敏的细胞表面,引起细胞溶解,称为反应性溶细胞作用 (Reactive lysis)。因此,补体的支路激活在人类多种免疫性疾病,如 Coomb 氏阳性溶血性贫血症,遗传性血管神经性水肿,某些肾小球肾炎的发病机制中都可能起作用。从上述意义看来,补体在机体的防御系统中,不只是作为辅助抗体的"补体"起作用,并且还作为能引起炎症反应的中介因素而独立地起作用,甚至几乎补体反应每一步骤的产物都能产生独特的病理生物学效应。因此,在本章开始时提到的, Mayer 对补体下的经典的定义,补体"为抗原抗体复合物、γ-球蛋白聚集物或其他物质激活的溶细胞反应系统",已经不能概括补体作用的全部内容了。对补体系统的进化起源的研究,似乎也支持这种观点。目前发现甚至在某些无脊椎动物(如鲎)已存在功能上和高等脊椎动物的补体类似的因子 (Day 等, 1970)。或许补体作为一个非专一的血清防御系统,比免疫球蛋白在进化上有更为古老的历史,也不是不可能的。

六、补体反应的调节

补体反应在时、空上受到严格的限制。大多数激活的补体成分和复合物迅速蜕变,失去和细胞膜的结合能力,因而使膜的损伤能局限于激活点的附近,而不至漫无止境地扩展开来。除此以外,正常血清内还存在种种抑制因子或灭活因子。如从血清中已分离出一个 $C\bar{1}$ 酶活力的抑制因子,能定量地和 $C\bar{1}$ 结合 (Lepow 等, 1965)。几种动物血清中发现 C4 的灭活因子 (Jensen 等, 1968),以及 C3b 的灭活因子, C6b 的灭活因子。此外,人血清内还存在过敏毒素 (C3a, C5a) 的灭活因子,它们属于 11S 的 α-球蛋白

(Bokish 等, 1969)。 在正常情形下,通过这些调节因素的控制,补体反应才得以在严格限制的范围和程度上进行,达到防御外来感染的目的,而又不致破坏机体的完整性。

简短的结论

1. 补体系统是一组血清蛋白质,能被依顺序地激活,形成一系列的酶,引起生物膜的变化,最后导致膜的损伤和溶细胞作用。目前已知补体系统包括 9 个成分,至少 11 种蛋白质。补体激活过程中产生具有生物活力的片段或复合物,如白血球化学吸引素、过敏毒素等。

2. 补体系统作为抗体抗原系统的效应分子在机体防御系统中起重要作用。 抗体通过对靶细胞(细菌、肿瘤细胞等)表面抗原的识别和相互作用,激发全套补体成分参加的链锁反应,导致膜的损伤和细胞的杀伤。除去通过免疫反应激活的主要途径外,补体系统还可通过支路激活,作为一个独立的防御系统起作用。

3. 补体的生物学作用和生物膜有密切关系。补体的激活和作用也局限在膜上进行。补体及其产物至少从四方面影响膜:

1) 引起细胞膜不可逆损伤、导致细胞的死亡;

2) 引起膜结构的变化,释放出活性物质,如肥大细胞释放组织胺;

3) 激活细胞膜上的酶,而诱发膜的行为改变,如多形核白血球的定向迁移;

4) 补体成分的附着诱发膜表面性质的变化而发生细胞间的免疫粘着现象并促进吞噬作用。

补体直接或间接地作用于细胞膜而诱发依赖补体或其产物的继发的病理生物学过程,如溶细胞作用,白血球定向迁移,炎症反应、吞噬活动和过敏反应等重要的现象。总之,补体系统,不论通过免疫反应或独立地起作用,都是维持机体完整性,或在各种免疫病理条件下引起组织损伤的一个重要的化学介质系统。

参 考 资 料

专著和综述

Ingram, D. G. ed. (1972). Biological Activites of Complement. Karger, Basel.

Haurowitz, F. (1968). Immunochemistry and biosynthesis of antibodies, p. 147—161.

Mayer, M. M. (1961). Complement and complement fixation, In: "Experimental Immunochemistry," 2nd ed. Kabat, E. A. and Mayer, M. M. ed., Springfield, Ill., Charles C. Thomas. Publisher, p. 133.

Mayer, M. M. (1970). Highlights of complement research during the past 25 years. *Immunochem.* 7. 485.

Mayer, M. M. (1973). The complement System. *Sci. Amer.* 229(5), 54.

Osler, A. G. (1976). Complement. Mechanisms and Functions. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J.

Müller-Eberhard, H. J. (1969). Complement Ann. Rev. Biochem. 38, 390.

Müller-Eberhard. H. J. (1972). The molecular basis of the biological activites of complement. Harvey Lecture Ser. 66(1970—71), 75.

Müller-Eberhard, H. J. (1974). Patterns of complement activation. Progress in Immunol. II., Vol. 1 Immunochem. Asp., p. 173.

Müller-Eberhard, H. J. (1975). Complement. *Ann. Ren. Biochem.* 44, 697.

Rapp H. J. and Borsos, T. (1970). Molecular basis of complement, action. Appleton-Century Crofts, N. Y.

Schultz, D. R. (1971). The Complement System. Basel, Karger.

Wolsteinholme, G. E. W. and Knight, J., ed. (1965). Complement, Ciba Foundation Symp.

论文

Alper, C. A., Johnson, A. M., Birtch, A. J. and Moore, F. D. (1969). Human C'3. Evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science* **163**, 286.

Alper, C. A., Abramson, N., Johnston, R. B., Tandl, J. H. and Rosen, F. S. (1970). Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement-mediated functions and of the third component of complement (C3). *New Engl. J. Med.* **282**, 349.

Alper, C. A. and Rosen, F. S. (1972). Genetic considerations. In: "Biological Activities of Complement", Karger, Basel. p. 260.

Alper, C. A. and Balavitch, D. (1975). Cobra venom factor: Evidence for its being altered cobra C3 (the third component of complement). *Science* **191**, 1275.

Arroyave, C. M. and Müller-Eberhard. H. J. (1971). Isolation of the sixth component of complement from human serum. *Immunochem.* **8**, 995.

Assimeh, S. N. and Painter, R. H. (1975). The macromolecular structure of the first component of complement. *J. Immunol.* **115**, 488.

Bokisch, V. A. and Müller-Eberhard, H. J. (1970). Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J. Clin. Invest.* **49**, 2427.

Bokisch, V. A., Dierich, M. P. and Müller-Eberhard, H. J. (1975). Third component of complement (C3): Structural properties in relation to functions. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **72**, 1989.

Borsos. T., Dourmashkin, R. R. and Humphrey, J. H. (1964). Lesions in erythrocyte menbranes caused by immune haemolysis. *Nature* **202**, 251.

de Bracco, M. M. E. and Stroud, R. M. (1971). Clr, subunit of the first complemet component: purification, properties, and assay based on its linking role. *J. Clin. Invest.* **50**, 838.

Calcott, M. A. and Müller-Eberhard, H. J. (1972). Clq protein of human complement. *Biochemistry* **11**, 3443.

Colten, H. R., Borsos, T. and Rapp, H. J. (1966). In vitro synthesis of the first component of complement by guinea pig small intestine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **56**, 1158.

Colten, H. R., Gordon, J. M., Borsos, T. and Rapp, H. J. (1968) Synthesis of the first component of human complement in vitro. *J. Exp. Med.* **128**, 595.

Colten, H. R. and Wyatt, H. V. (1972). Biosynthesis of serum complement. In: "Biological Activities of Complement". ed. Ingram, D. G., Karger, Basel. p. 244.

Cook, C. T., Shin, H. S. Mayer, M. M. and Landenslayer, K. A. (1971). The fifth component of the guinea pig complement system. I. Purification and characterization. *J. Immunol.* **106**, 467.

Corbin, N. C. and Hugli, T. E. (1976). The primary structure of porcine C3a and phylatoxin. *J. Immunol.* **117**, 990.

Day, N. K., Gewurtz, H., Johannsen, R., Finstad, J. and Good, R. A. (1970). Complement and compelment-like activity in lower vertbrates and invertebrates. *J. Exp. Med.* **132**, 941.

Dourmaskin, R. R., Hesketh, R., Humphrey, J. H., Medhurst, F. and Payne. S. N. (1972). Electron microscopic studies of the lesions in cell menbranes caused by complement. In: "Biological activities of Complement", Karger, Basel. p. 89.

Gewurz, H. (1972). Alternante pathways to activition of the complement system. In: "Biological Activities of Complement", Karger. Basel. p. 56.

Gewurz, H. (1973). The immunologic role of complement. In: "Immunobiology", ed. Good, R. A., and Fisher, D. W., Sinauer Associates Inc., p. 95.

Goodkofsky, I. ,Stewart, A. and Lepow, I. H. (1973). Relationship of C3 and factor A of the properdin system. *J. Immunol.* **111**, 287.

Gotze, O. and Müller-Eberhard, H. J. (1973). The role of properdin in the alternate pathway of C activation. *J. Immunol.* **111**, 289.

Hadding, U., Müller-Eberhard, H. J., and Dalmasso, A. P. (1966). Isolation of the terminal component of human complement. *Fed. Proc.* **25**, 485.

Haines, A. L. and Lepow, I. H. (1964). Studies on human C'1-esterase. II. Function of purified C'1-esterase in the human complement system. *J. Immunol.* **92**, 468.

Hammer, C. H., Nicholson, A. and Mayer, M. M. (1975). On the mechanism of Lysiss by complement: Evidence on insertion of C5b and C7 subunits of the C5b, 6,7 complex into phospholipid bilayers of erythrocyte membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **72**, 5076.

Henson, P. M. (1972). Complement-dependent adherence of cells to antigen and antibody. Mechanisms

and consequences. In: ''Biological Activities of Complement'' p. 173 (Karger. Basel).

Hugli, T. E. (1974). Amino acid sequence of human C3a anaphylatoxin. *Fed. Proc.* **33**, 1236.

Humphrey, J. H. and Dourmashkin, R. R. (1965). Electron microscope studies of immune cell lysis. In: ''Ciba Foundation Symp. on Complement'', ed. Wolstenholme, G. E. W., and Knight, J., London, J. & A. Churchill Ltd., p. 175.

Humphrey, J. H. and Dourmashkin. R. R. (1969). The lesions in cell membrane caused by complement. *Adv. Immunol.* **11**, 75.

Ingram, D. G. (1972). Biological aspects of conglutinin and immunoconglutinins. In: ''Biological Activities of Complement'', p. 215. (Karger, Basel).

Ishizaka. T., Ishizaka, K,. Borsos. T. and Rapp, H. J. (1966). C'1 fixation by human isoagglutinins: Fixation of C'1 by γ G and γM but not by γ A antibody. *J. Immunol.* **97**, 716.

Ishizaka, T., Ishizaka, K.. and Fudenberg, H. (1967). Biologic activities of aggregated γ-globulin. VIII. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J. Immunol.* **99**, 82.

Jensen, J. (1967). Anaphylatoxin and its relation to the complement system. *Science* **155**, 1122.

Jensen, J. A., Sigel, M. M. and Ross, G. D. (1968). Some characteristics of natural antibody, complement, and a C'4 inactivator from nurse shark serum. *J. Immuol.* **101**. 816.

Jensen, J. A. (1972). Anaphylatoxin (s). In: ''Biological Activities of Complement'', p. 136 Karger. Basel`.

Ingram, D. G. and Quinn, P. J. (1972). Components and reaction sequence. In: ''Biological Activities of Complement''. p. 2 Karger. Basel.

Kaliner, M. and Austen, K. F. (1974). Adenosine 3′,5′-monophosphate: inhibition of complement mediatel cell lysis. *Science* **183**, 659.

Keller, H. U., Nussenzweig. V. and Sorkin, E. (1968). Studies on chemotaxis. VIII. The role of 7S 1 and 7S 2 guinea pig antibodies for chemotaxis in granulocytes. *Immunochem.* **5**, 293.

Knobel, H. R., Villiger, W. and Isliker, H. (1975). Chemical analysis and electron microscopy studies of human Clq prepared by different methods. *Europ. J. Immunol.* **5**, 78.

Kohler, R. F. and Bensel, R. Ten (1969). Serial complement component alterations in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **4**, 191.

Kohler, P. F. and Müller-Eberhard, H. J. (1967). Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of heath adults. *J. Immunol.* **99**: 1211.

Lachmann, P. J., Elias, D. E. and Moffett, A. (1972). Conglutinin and immunoconglutinins. In: ''Biological Activities of Complement'', p. 202 (Karger,Basel).

Lachman, P. J. and Nicol, P. A. Z. (1973). Reaction mechanisms of the alternative pathway of complement fixation. *Lancet* **1**, 465.

Lachman, P. J., Bowyer, D. E., Nicol, P., Dawson, R. M. C. and Munn. E. A. (1973). Studies on the terminal stages of complement lysis *Immunol.* **24**, 135.

Lepow, I. H., Naff, G. B. and Pensky, J. (1965). Mechanism of activation of C'1 and inhibition of C'1 esterase. In: ''Ciba Foundation Symp. on Complement'', ed. Wolstenholme, G. E. W. and Knight, J., p. 74.

Lepow, I. H. (1971). Permeability producing peptide byproduct of the interaction of the first, fourth and second components of complement. In: ''Biochemistry of the acute allergic reactions'', ed Austen. K. F. and Becker, E. L., Blackwell,Oxford, p. 205.

Levy, N. L., Snyderman, R, Ladda, R. L. and Lieberman, R. (1973). Cytogenetic engineering in vivo: restoration of biological complement activity to C5-deficient mice by intravenous imoeulation of hybrid cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 3125.

Manni, J. A. and Müller-Eberhard, H. J. (1968). Purification of human C'8 and inhibition of its activity by spicific antibody. *Fed. Proc.* **27**, 479.

McConnell, I. and Lachman, P. J., (1977). Complement receptors and cell associateh complement components. *Immunol. Comm.* **6**, 111.

Minta, J. O. and Lepow, I. H. (1974). Studies on the subunit structure of human properdin. *Immunochem.* **11**, 361.

Miller, M. F. and Nilsson, U. R., (1970). A familial deficiency of the phagocytosis enhancing activity of serum related to a dysfunction of the fifth component of complement (C5). *New. Engl. J. Med* 282, 354

Molenaar, J. L., Müller, M. and Pondman, K. W. (1973). A new preparative method for isolation of human C3 with affinity chromatography. *J. Immunol.* **110**, 1570.

Morgan. W. T., Vallta, E. H. and Müller-Eberhard, H. J. (1974). Circular dichroism of C5a anaphylatoxin of porcine complement. *Biophy. Biochem Res. Commu.* **57**, 572.

Müller-Eberhard. H. J. and Kunkel, H. G. (1961). Isolation of a thermallabile serum protein which pricipitates γ-globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **106**, 291.

Müller-Eberhard, H. J. and Biro, C. E. (1963). Isolation and description of the fourth component of human complement. *J. Exp. Med.* **118**, 447.

Müller-Eberhard, H. J. and Calcott, M. A. (1966). Interaction between C'1q and γ G-globulin. *Immunochem.* **3**, 500.

Müller-Eberhard, H. J. and Vallota, E. H. (1971). Formation and inactivation of anaphylatoxins. In: ''Biochemistry of the acute allergic reactions''ed. Austen, K. F. and Becker. E. L., Blackwell. Oxford, p.217.

Nagkaki, K. and Stroud, R. M. (1969), Spocific antisera to Cls: Detection of different electrophoretic species to Cls *J. Immunol.* **103**, 111.

Nelson, R. A. (1953). The immune-adherence phenomenon. An immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. *Science* **118**, 733.

Nelson, R. A. (1958). An alternate mechanism for the properdin system. *J. Exp. Med.* **108**, 515.

Nilsson, U. R. and Müller-Eberacrd, H. J. (1965). Isolation of β 1F-globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. *J. Exp. Med.* **122**. 277.

Nilsson, U. R., Tomar, R. H. and Taylor, F. B. (1972). Additional studies on human C5: development of a modified purification method and characterization of the purification product by polyacrylamide gel electrophoresis. *Immunochemistry* **9**, 709.

Nilsson. U. R., and Mapes, J. (1973). Polyacrylamide electrophoresis (PAGE) of reduced and dissociated C3 and C5: studies of the polypeptide chain (PPC) subunits and their modification by trypsin (TRY) and C42-C423. *J. Immunol.* **111**. 293.

Nomenclature of complement components. Bull. Wld. Hlth. Org. 39, 935; 1968.

Nomenclature of complement. *Immunochem.* **7**, 143.

Ogg, C. S. Cameron, J. S. and White, R. H. R. (1968). The C3 component of complement β^{1c}-globulin) in patients with heavy proteinuria. *Lancet* ii, 78—81.

Opferkuch. W., Rinhelmann, R. and Klein, P. G. (1968). Characterization of a C'4 inactivator and its generation from guinea pig euglobulin *J. Immunol.* **101**, 815.

Osler, A. C., Randall, H. G.. Hill, B. M. and Ovary. Z. (1959). Studies of the mechanism of hypersensitivity phenomena. III. The participation of complement in the formation of anaphylatoxin.*J. Exp. Med.* **110**, 311.

Pensky, J., Hinz, C. F. Todd, E. W. Wedgwood, R. J., Boyer, J. T. and Lepow, I. H. (1968). Properties of highly purified human properdin. *J. Immunol.* **100**, 142

Pinteric, L., Assimeh, S. N., Kells, D. I. C. and Painter, R. H. (1976). The ultrastructure of C1, asubcomponent of the first component of complement: An electronmicroscopic and ultracentrifuge study *J. Immunol.* **117**, 79.

Pillemer, L. Blum, L. Lepow, I. H. Ross. O. A. Todd E. W. and Wardlaw, A. C. (1954). The properdin system and immunity. I, Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* **120**, 279.

Polley, M. J. and Müller-Eberhard, H. J. (1968). The second component of human complement: I's isolation, fragmentation by C'1 esterase and incorporation into C'3 convertase. *J. Exp. Med.* **128**, 533.

Polley, M. J., Müller-Eberhard. H. J. and Feldman, J. D. (1971). Production of ultrastructural membrane lesions by the fifth component of complement. *J. Exp. Med.* **133**, 53.

Polley, M. J., Müller-Eberhard, H. J. and Feldman, J. D. (1972). Production of ultrastructure membrane lesions by the fifth component of complement. In: ''Biological Activities of Complement'', p. 96 (Karger, Basel).

Ratnoff, O. D. (1973). The interrelationship of clotting and immunologic mechanisms. In: ''Immunobiology'', p. 135.

Reid, K. B. M. (1974). A collagen-like amino acid sequence in a polypeptide chain of human Clq (a subcomponent of the first component of complement). *Biochem. J.* **141**, 189.

Reid, K. B. M. (1976). Isolation. by partial pepsin digestion. of the three collagen-like regions present in subcomponent Clq of the first component of human complement. *Biochem. J.* (Mol. Asp) **155**,

5.

Reid, K. B. M. and Porter, R. R. (1976). Subunit composition and structure of subcomponent Clq of the first component of human complement. *Biochem. J. (Mol. Asp.)* **155**, 19.

Rommel, F. A. and Mayer. M. M. (1973). Studies of guinea pig complement component C9: reaction Kirectics and evidence thatlysis of EACI 8 results from a single membrane lesion caused by one molecule of C9. *J. Immunol.* **110**, 637.

Rosen, F. S., Charache, P., Pensky, J. and Donaldson, V. (1965). Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. *Science* **148**. 957.

Rother, K., Rother. U., Müller-Eberhard, H. J. and Nilsson, U. R. (1966). Deficiency of the sixth component of complement in rabbits with an inherited complement defect. *J. Exp. Med.* **124**. 773.

Rubin, D., Borsos, T. Rapp, H. J. and Colten, H. R. (1971). Synthesis of the second component of guinea pig complement. *J. Immunol.* **106**. 295.

Ruddy. S. and Austen, K. F. (1972). Natural control mechanisms of the complement system. In: "Biological Activities of Complement", p. 13. Karger. Basel.

Sakai, K. and Stroud, R. M. (1973). Purification. molecular properties, and activation of Cl proesterase, Cls. *J. Immunol.* **110**. 1010.

Sakai, K. and Stroud, R. M. (1974). The activation of Cls with purified Clr. *Immunochem.* **11** 191.

Sassano, F. G., Colten, H. R., Borsos, T. and Rapp H. J. (1972). Restoration of the first component of guinea pig complement into three subunits Clq, Clr, Cls and their hybridization with human Cl subunits *Immunochem.* **9**, 405.

Schur, P. H. and Austen, K. F. (1968). Complement in human disease. *Annu. Rev. Med.* **19**, 1.

Seeman. G. H. P. Naylor, D. and Cinader, B. (1973). Menmbane lesions in immune lysis. Surface rings globule aggregates, and transient openings. *J. Cell. Biol.* **56**, 528.

Shelton, E., et al. (1972). Ultrastructure of the human complement component Clq. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 65.

Shin, H. S., Smith, M. R. and Wood, W. B. (1969). Heat labile opsonins to Pneumococcus. II. Involvement of C3 and C5. *J. Exp. Med.* **130**. 1229.

Shin, H. S. and Mayer, M. M. (1968). The third component of the guinea pig complement system II. Kinetic study of the reaction of EAC'4 2a with guinea pig C'3 Enzymatic nature of C'3 consumption. multiphasic character of fixation, and bemolytic titration of C'3. *Biochem.* **7**, 2997.

Stecher, V. J. and Thorbecke, G. J. (1967a). Sites of synthesis of serum proteins. I. Serum proteins produced by macrophages in vitro. *J. Immunol.* **99**, 643.

Stecaher, V. J. and Thorbecke, G. J. (1976b). II. Medium requirements for serum protein production by rat macrophages. *J. Immunol.* **99**, 653.

Svehag. S. E.. Manhem, L. and Bloth, B. (1972). Ultrasructure of human Clq protein. *Nature New Biol.* **238**, 117.

Valte. C. and Cooper, N. R. (1974). Isolation and characterization of the proenzyme form of the Clr subunit of the first complement component. *J. Immunol.* **112**, 1667.

Vallota, E. H. and Müller-Eberhard. H. J. (1973).Formation of C3a and C5a anaphylatoxins in whole human serum after inhibition of the anaphylatoxin inhibitor. *J. Exp. Med.* **137**, 1109.

Volanakis. J. R. and Stroud, R. M. (1972). Rabbit Clq: purification. functional and structural studies *J. Immunol. Methods* **2**. 25.

Vroon. D. H., Scultz, D. R. and Zarco, R. H. (1970). The separation of nine components and two inactivators of components of complement in human serum. *Immunochem.* **7**, 43.

Ward, P. A. (1972). Complement-derived chemotactic factors and their interactions with neutrophilic granulocytes. In: "Biological Activities of Complement", p. 108 (Karger. Basel).

Wagner, H. and Röllinghoff, M. (1970). C2-the second component of guinea pig complement: purification and physico-chemical characterization. *Immunochem.* **7**, 977.

Wyatt, H. V. (1974a). Measurement of the second and fourth components of rat complement. *Europ. J. Immunol.* **4**, 39.

Wyatt, H. V. (1974b). Synthesis of the second and fourth components of complement by tissue culture cell lines. *Europ. J. Immunol.* **4**, 34.

Wissler, J. H. (1972). Chemistry and biology of the anaphylatoxin related serum peptide system. I. Purification, crystallization and properties of classical anaphylatoxin from rat serum. *Europ. J. Immunol.* **2**, 73.

II. Purification, crystallization, and properties of cocytotaxin, a basic peptide from rat serum.

Europ. J. Immunol. **2**, 84.

III. Evaluation of leucotactic activity as a property of a new peptide system with classical anaphylatoxin and cocytotaxin as components. *Europ. J. Immunol.* **2**, 90.

Ziccardi, R. J. and Cooper, N. R. (1976). Physicochemical and functional characterization of Clr subunit of the first complement component. *J. Immunol.* **116**, 496.

Zimmerman, T. S., Arroyave, C. M. and Müller-Eberhard H. J. (1971). A blood coagulation abnormality in rabbits deficient in the sixth component of complement (C6) and its correction by purified C6* *J. Exp. Med.* **134**, 1591.

Zimmerman, T. S. and Müller-Eberhard, H J. (1971). Blood coagulation initiation by a complement mediated pathway. *J. Exp. Med.* **134**, 1601.

第四篇　抗体的合成——信号、受体和基因

近十多年来分子生物学在蛋白质合成的遗传控制和细胞分化中基因表现之一般规律的研究成果，促进了对于担任特殊免疫功能的细胞——淋巴球的基因表现和抗体合成研究的进展。

分子生物学在微生物上阐明了蛋白质合成遗传控制的信息传递途径——DNA 分子荷载的遗传信息，通过 m RNA 的转录，到达核糖核蛋白体上作为蛋白质合成的样板；同时还提出了控制基因表现的操纵子学说。高等动物细胞的分化当然要复杂得多。但从分子水平看来，归根结蒂仍然是基因按一定时、空顺序选择地激活的结果。激素作用机制的研究还表明，信息分子（激素）如何通过同细胞表面或内部的专一受体分子结合，再经次级信使分子（环式核苷酸）或其他方式传入核内，选择地激活有关基因，导致专一蛋白质的合成。这些概念无疑有助于对抗体合成分子机制的了解。

另一方面，从五十年代末期，Jerne 和 Burnet 提出获得性免疫的无性细胞繁殖系选择学说以来，随着小淋巴球的功能，T 和 B 淋巴球及其亚群的功能分化，以及它们在抗体形成中之协同作用的发现，细胞免疫学的这些新成就，也为分子免疫学提出了许多新概念和新问题。既然抗体合成是一个特殊功能细胞——B 淋巴球的基因表现问题，对这个问题的研究就不能局限在抗体分子，而应当深入到淋巴细胞表面分子结构，抗原分子和细胞之间，细胞和细胞之间相互作用的分子机制。目前分子免疫学的发展也正是沿着向细胞免疫学渗透、融合的方向，研究各类淋巴球表面抗原受体的构造及其识别功能，抗原和淋巴球表面受体的相互作用，膜上的信号如何传回核内使基因选择地激活，再通过转录、翻译过程合成重链和轻链，并装配成完整的抗体分子等一系列基因表现的调控过程。概括地说，当前分子免疫学在这方面研究的主题就是：信号、受体和基因。其中为免疫系统所特有的，也是最困难的问题是抗体多样性起源及其遗传控制的问题。这些问题的研究和解决也必然会反转过来促进对于一般细胞的识别机制，高等动物细胞分化、细胞生长控制、遗传等基本生物学问题研究的进展。这也许是淋巴球作为真核细胞基因表现的调节控制的模型，日益受到分子生物学家和细胞生物学家重视的原因。

以下各章将分别讨论淋巴球表面抗原受体的性质和构造，抗原对 B 淋巴球的激活，抗体的多肽链的合成和装配，免疫球蛋白的基因结构，以及免疫球蛋白和免疫反应的遗传控制等方面的问题。关于抗体多样性起源问题了解还很少，只能就各家的看法作一些简略的介绍。

第十三章　抗原和淋巴细胞的相互作用——抗体反应的触发机制

抗体合成的最初阶段——即抗原和B淋巴球表面受体的相互作用，受到免疫活性细胞间的协同作用的很大影响。对于大多数抗原，抗体反应需要B淋巴球和T淋巴球间的协同作用，巨噬细胞也可能参与作用。如第一章已讲过的（见14页），对载体效应的分析发现对一个复杂的抗原的抗体反应需要反应细胞对同一分子的不同部位同时地和分别地进行识别，T细胞专一地识别载体决定簇，而B细胞识别半抗原决定簇。免疫反应的专一性又取决于这两种细胞的表面受体对抗原的结合专一性。这些细胞表面受体的性质和构造，以及几种细胞间的协同作用的机制，已成为研究抗体合成的发动的关键。在讨论从分子水平来探讨这些问题得到的结果以前，先谈一下免疫反应中细胞相互作用的现代概念。

一、免疫反应中细胞协同作用的现代概念

六十年代细胞免疫学最重要的研究成果是发现了两类淋巴球功能上的分化，以及它们在抗体形成中的协同作用。来源于骨髓的B淋巴球是产生抗体的前体细胞。但是对于大多数抗原(所谓胸腺依赖性抗原)，还需要有来自胸腺的T淋巴球以及巨噬细胞参加。T细胞对免疫反应起着关键的调节作用，控制着反应的类型(免疫反应或耐受性)、抗体的类别和反应的强度。最近还发现这些起调节作用的T细胞在功能上又可分为两类：一类对抗体反应起促进作用，称为辅助细胞（Helper cell）；一类起抑制作用，称为抑制细胞（Suppessor cell）。它们可以根据细胞表面的标志不同而区别开来：带有Ly1表面标志的T细胞亚群起促进作用，而带有Ly 2^+标志的亚群则起抑制作用（Cantor 等，1976；Jandinski 等，1976)。对抗原的任何反应（产生抗体或耐受性）都可能是这两类细胞互相拮抗作用的结果。

（一）淋巴细胞间的协同作用

关于T、B细胞间协同作用的机制，目前还是免疫学界正在热烈争鸣的问题。一般认为T细胞在抗体反应中的作用是更有效地把抗原提供给B细胞。最初有人假定T细胞表面的载体决定簇受体能起集中抗原的作用，把形成适当空间排布的抗原决定簇网架提供到B细胞表面，从而激活B细胞。这一假定的机制要求T细胞和B细胞通过抗原分子的“搭桥”而互相接触(图13-1)。然而，也有证据表明细胞间的协同作用可能是通过T细胞产生的可溶性因子进行的。

Nossal 实验室的工作者利用双层培养小室，以分离的T、B细胞和巨噬细胞配合成

的抗体形成系统研究这一问题(图 13-2)。当 T 细胞和 B 细胞被一层细胞通不过的微孔

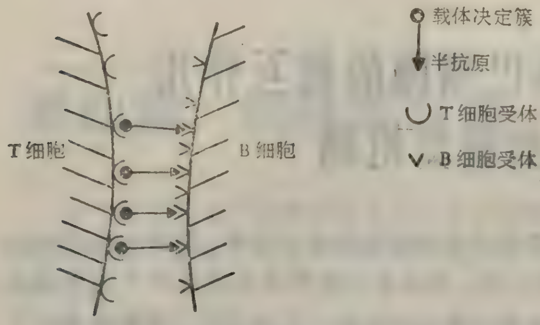


图 13-1 细胞协同作用可能的机制· T,B 细胞直接通过抗原"搭桥"。

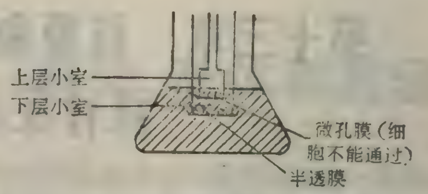


图 13-2 离体抗体形成系统。Feldman 和 Basten 双层培养小室。T 细胞放在上层小室内，含 B 细胞的脾脏细胞放在下层小室内，中间被一层微孔膜隔开，细胞不能通过而蛋白分子可自由通过。培养 4～5 天后，检测脾脏细胞中空斑形成细胞 (PFC) 的数目。

表 13-1 细胞协同作用通过专一的可溶性 T 细胞因子起作用的证明

上层小室		下 层 小 室	下层小室内的脾脏细胞对 DNP-KLH 的反应
无	细胞不能通过的微孔膜	T_{KLH} + DNP-接触过的脾脏细胞	+
T_{KLH}		DNP-接触过的脾脏细胞	+
T_{KLH}		DNP-接触过的脾脏细胞 (加抗-θ 免疫血清和 C′ 处理)	+
T (未受训练的)		DNP-接触过的脾脏细胞	−
无		DNP-接触过的脾脏细胞	−
T_{FGG}		DNP-接触过的脾脏细胞	−

T_{KLH} 示用钥孔蝛血蓝朊 (KLH) 训练过的 T 细胞。
T_{FGG} 示用鸡 IgG(FGG) 训练过的 T 细胞。
(据 Feldman 和 Basten, 1972)。

薄膜隔开时，受到适当抗原刺激的 T 细胞仍然能产生专一的可溶性因子，促进 B 细胞的抗体反应。如表 13-1 所示，在上层小室内放经过载体蛋白 KLH 训练过的 T 细胞 (T_{KLH})，或经另一种载体蛋白 FGG 训练过的 T 细胞 (T_{FGG})。下层小室内放和半抗原接触过的脾脏细胞。然后，当用 DNP-KLH 刺激时，T_{KLH} 组的 B 细胞能形成抗体，而 T_{FGG} 组则不能，表现出对抗原反应的专一性 (Feldman 和 Basten, 1972)。进一步分析发现，T 细胞因子起作用还需要 B 细胞群中有巨噬细胞存在才行。

(二) 巨噬细胞和淋巴细胞间的相互作用

淋巴细胞对大多数抗原的免疫反应都需要有巨噬细胞参加 (Unanue, 1972)。巨噬细胞的作用一方面是处理抗原；另一方面，在 T、B 细胞之间还可能起提供抗原的居间作用。Feldman (1972) 发现 T 细胞产生的专一的辅助因子对巨噬细胞表面有亲合性。在双层培养小室内，如果下层小室只放巨噬细胞，上层小室仍然放经过 KLH 训练的 T 细胞 (T_{KLH}) 和专一抗原。这样培养一两天后，再把经过洗涤的巨噬细胞加入到和 DNP-半抗原接触过的 B 细胞培养中，无需加抗原就能有效地促进这些 B 细胞产生抗 DNP 抗体。这一实验证明细胞间协同作用机制可能是 T 细胞产生的专一因子单独地或

与抗原结合后，能附着在巨噬细胞表面，再通过致敏的巨噬细胞把排列在其表面的抗原提供给B细胞表面的抗原受体，引发抗体反应(图13-3)。

值得注意的是，有证据表明当带抗原的巨噬细胞和T淋巴球的主要组织相容性基因复合物(MHC)为同基因型配合时所引起B细胞的增生反应，要比异基因型配合时更大(Rosanthal 和 Shevach，1973)。这提示巨噬细胞的作用可能不限于提供抗原，还可能通过某种细胞识别方式参与和淋巴球的相互作用。同样地，也有证据指出淋巴细胞表面MHC基因产物和免疫反应中细胞相互作用有密切的关系。总之，巨噬细胞和T淋巴球间，T淋巴球和B淋巴球间相互作用关系的实验事实都提示MHC及I-区基因编码的抗原决定簇在这几种细胞间的识别和免疫反应的调节中，可能起重要的作用(Paul 和 Benacerraf，1977)。

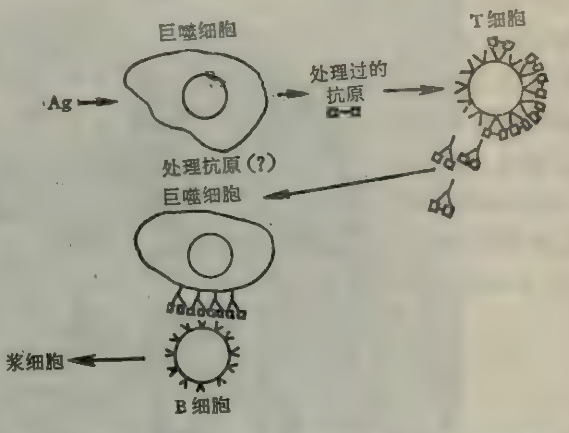


图13-3 T细胞和B细胞协同作用机制简图。图中巨噬细胞起双重作用，一种作用是处理抗原，另一种作用是集中T细胞产生的协作因子，并将和抗原结合的这些因子提供给未受刺激的B细胞(据 Feldman，1972)。

细胞免疫学揭示的免疫反应中细胞协同作用的现代看法向分子免疫学提出了许多新课题。诸如各类淋巴细胞表面抗原受体的性质和构造，特别是T淋巴球表面的识别构造和I-区基因产物的关系，以及T，B淋巴细胞各亚群间的相互识别和免疫反应的调节机制的关系，都是当前分子免疫学正在热烈研究而未完全解决的问题。

二、淋巴细胞表面的抗原受体

淋巴细胞表面抗原受体的性质和构造是多年来使免疫学家们困惑不解的难题。远在1900年，Ehrlich 鉴于抗原抗体结合的高度专一性，曾经推测免疫细胞表面的抗原受体可能就是抗体。目前已积累了大量证据和免疫学现象提示B淋巴球表面的抗原受体是免疫球蛋白，并且又直接从B细胞表面分离出免疫球蛋白，证明对抗原有结合专一性。至于T淋巴球表面抗原受体的性质问题，还存在分歧意见，尚悬而未决。

(一)B 淋巴球表面抗原受体为免疫球蛋白的间接证据

这些证据主要是通过对抗原和淋巴球表面的结合专一性、免疫球蛋白抗血清能专一地抑制抗原和淋巴球结合等方面的研究工作取得的(Warner 等，1970；Nossal 和 Ada，1971；Ada 等，1973)。

1. 抗原和B淋巴球表面专一的结合

Nossal 实验室的工作者利用放射性同位素标记的抗原(如^{125}I-标记的血蓝朊或鞭毛

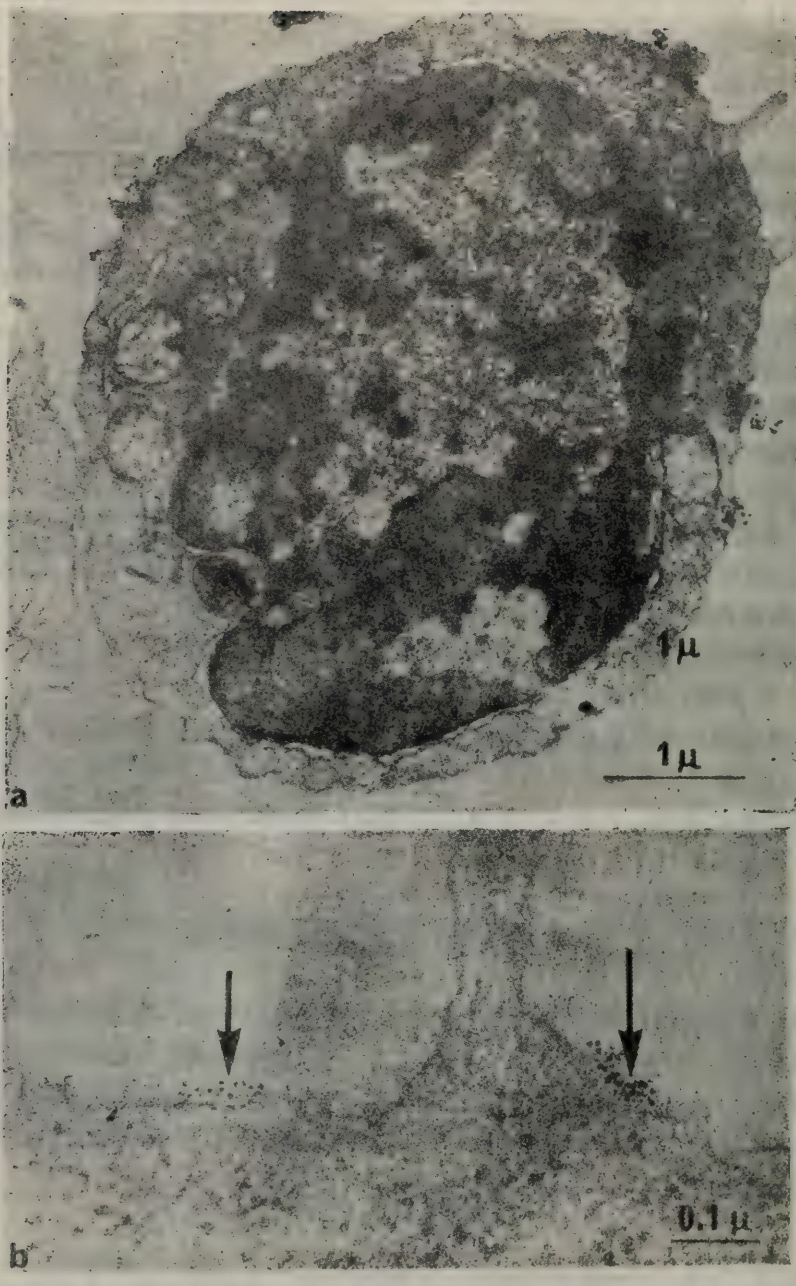


图 13-4 抗原和淋巴球表面结合的电子显微镜图象。(a)^{125}I 血蓝朊标记的淋巴球放射自显影的电子显微镜图象，细胞表面少数几处可看到标记抗原，×20,000。 (b) 铁蛋白离体标记的淋巴球的一部分，×115,000（据 Nossal 和 Ada，1971）。

素）处理小鼠的脾脏细胞，再用放射自显影法检查标记的细胞。结果发现全部细胞群中只有极少数细胞被标记。为抗原标记的细胞数目，随所用抗原浓度而变动，其上限在 1—2%。对于一定的抗原，结合抗原的细胞的频率介于 10^{-2}到 10^{-5}之间（Ada，1970）。这些结果是和 Burnet 的细胞株选择学说所预测的相符合的，也就是说在和抗原接触前，

淋巴细胞群中就存在多种多样的抗原结合专一性的细胞，其中个别细胞只存在一种结合专一性的表面抗原受体。

用电子显微镜观察和^{125}I-标记抗原结合的细胞，从放射自显影图象上银粒的分布指示出抗原分子位于淋巴球的表面（图 13-4）（Mandel 等，1970）。加过量的未标记抗原，或事先用免疫球蛋白抗血清处理细胞，都能专一地抑制抗原和细胞的结合。这些事实都提示 B 淋巴球表面存在专一的抗原受体，其性质可能是免疫球蛋白。进一步用各种专一的轻链或重链抗血清作分析的结果表明，小鼠脾脏细胞表面的免疫球蛋白主要是 IgM（Warner 等，1970）。后来这一观察得到广泛的证实（Raff，1970；Rabillino 等，1971；Bankhurst 和 Warner，1971；Vitteta 等，1971）。此外，还发现羊和家兔 B 淋巴球表面受体主要为 IgM（Pernis 等，1970），而豚鼠可能为 IgG（Davie 和 Paul，1971）。

2. 放射性标记抗原对淋巴细胞的专一杀伤作用

在用叠氮钠抑制细胞的主动吞噬活动的条件下，把标记强度很高的 ^{125}I-抗原加入到淋巴细胞培养。过 24 小时后，再把这样处理过的细胞接种到经过 X 射线照射过的小鼠体内，结果寄主对于这一抗原产生抗体的能力便大大减弱了，而对其他抗原的抗体反应却不受影响。对照实验中，细胞是和非放射性^{127}I-标记抗原结合，则不出现上述现象。显然，和细胞结合的放射性标记抗原的辐射（^{125}I 放出的 β 射线的穿透能力约为 10 微米）能专一地损伤产生针对这种抗原的抗体的前体细胞（Ada 和 Byrt，1969）。

3. 半抗原对抗原和淋巴球结合的专一抑制

如果淋巴细胞表面确实存在类似抗体分子的抗原受体，事先用游离的半抗原处理细胞，则应能专一地抑制细胞对该半抗原和载体蛋白复合物的免疫反应。许多实验表明确系如此。

Mitchison（1967）最先发现在离体系统中，加入能和某一半抗原起交叉反应的结构类似物，便能抑制淋巴细胞对该半抗原的次级免疫反应。同样地，若在把接触过抗原的脾脏或淋巴结细胞接种到经 X 射线照射过的受主体内之前，这些细胞先和半抗原保温，结果它们后来在体内对该半抗原的次级反应也受到抑制（Cross 和 Mäkelä，1968）。上述实验中，半抗原抑制现象是暂时的，可逆的。如果改用“亲合标记”半抗原，使和抗体的结合位点发生共价结合，就能产生持久的抑制效果。Segal 等（1969）利用 DNP 半抗原的溴乙酰衍生物作抑制实验，发现这种“亲合标记”半抗原在离体系统中能持久而强烈地抑制对该半抗原的次级免疫反应；而在对照的抗体诱导系统中，对其他抗原的产生并无影响。这说明不是对细胞的毒性作用，而是半抗原专一的抑制现象。

B 淋巴球表面有半抗原受体存在，还被这些细胞能被固相半抗原免疫吸附柱选择地阻留所证实。正常或免疫的动物的淋巴细胞，通过固相半抗原（半抗原联结到琼脂糖珠上）做成的免疫吸附柱时，便被选择地阻留。这些被阻留的细胞还能被同一半抗原从柱上洗脱下来（Waltrs 和 Wigzell，1970；Wofsy 等，1971）。这些被选择地阻留的细胞，经鉴定全是 B 细胞。

以上这些实验提示 B 淋巴球表面可能存在免疫球蛋白。然而，鉴于 B 细胞表面存

在 Fc 受体，B 细胞表面的免疫球蛋白有没有可能是循环中的抗体分子附着到这些细胞表面，而不是细胞表面固有的呢？Gell 和 Sell（1965）在对一个同种异型基因座为杂合子的新生家兔上的研究结果说明淋巴球表面免疫球蛋白很可能主要不是来自循环抗体，而是细胞本身产生的。已知新生家兔血清中的免疫球蛋白几乎全部来自母体，因为在杂合子新生家兔的血清中测不出有父方同种异型的免疫球蛋白存在。然而，用抗父方或母方同种异型的抗血清处理，都能同样充分有效地刺激新生家兔的淋巴球发生转化、增生。因此，这些起反应的淋巴细胞表面的免疫球蛋白很可能主要是来源于细胞本身，而不是由于循环抗体附着到细胞表面上。淋巴细胞表面免疫球蛋白呈现的等位基因互斥现象也支持这一结论。用双标记萤光抗体法研究杂合子家兔 B 淋巴球表面免疫球蛋白的分布时，开初在细胞表面可找到两种同种异型的免疫球蛋白。可是，当用酶处理去除细胞表面免疫球蛋白后继续培养一段时间，待免疫球蛋白重新形成后，细胞表面就只能显示出一种同种异型的免疫球蛋白了。这有力地提示杂合子淋巴球表面只有一个等位基因产物是膜上自己产生的，而另一种可能是附着到细胞表面上去的（Pernis 等，1970；参看 Paul，1973）。

从上述大量工作可以肯定 B 淋巴球表面确实有由细胞本身产生的抗原受体和免疫球蛋白存在。但是，二者的关系如何，抗原受体的性质是否就是免疫球蛋白，仍然是没有得到完全证明的。标记抗体示踪虽能指示 B 淋巴细胞表面有免疫球蛋白存在；抗免疫球蛋白的抗血清也能抑制抗原和淋巴球的结合，然而这些实验并不能严格证明这些位于细胞表面的免疫球蛋白分子就是抗原受体本身，因为所有利用抗免疫球蛋白的抗血清得到的间接证据，并不足以排除这些表面免疫球蛋白本身不是抗原受体，而只是在位置上紧密地贴近它们；当前者和抗免疫球蛋白的抗体结合时，就可能在空间上防碍抗原和真正的抗原受体分子的接近。此外，这些免疫球蛋白在膜上具体存在的分子形式也不清楚。因此，为了圆满地解决这些问题，就要求直接从淋巴细胞表面分离出膜结合的免疫球蛋白，并鉴定其化学构造和抗原结合专一性。

（二）淋巴细胞表面抗原受体的分离。性质和结构。

淋巴细胞表面抗原受体蛋白的量是微乎其微的。据估计淋巴细胞的细胞膜蛋白只占细胞干重的 0.04—0.05%（2—3 × 10^{-13} 克/细胞），而膜受体蛋白又仅占膜蛋白总量的约 1%！因此，淋巴细胞表面抗原受体的分离和鉴定是很困难的。为了解决这些困难，就必须采用特别精细的方法。

1. 淋巴细胞表面免疫球蛋白的分离和分析方法

为了解决这一问题，Marchalonis 等（1969—1974）建立了一个很灵敏的和专一的分离、分析淋巴细胞表面免疫球蛋白的方法。如图 13-5 所示，其原理如下：

1）膜蛋白的同位素标记。 借助乳酸过氧化物酶酶促碘化法，将 ^{125}I 标记到活细胞的表面膜蛋白上。经电子显微镜检查，证明只有细胞表面的膜蛋白被标记，而细胞内部的蛋白质不被标记。

2）膜蛋白的溶解。 用酸性尿素溶液（9 M 尿素加 10% 醋酸）或用非离子型表面

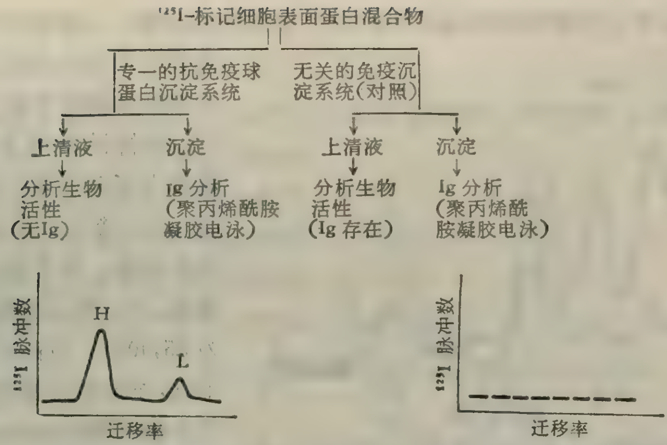


图 13-5 ^{125}I 标记细胞表面蛋白混合物中免疫球蛋白(Ig)之免疫学和生化分析的流程图(据 Marchalonis, 1974)。

活性剂NP-40溶解膜蛋白。另一个办法是把标记细胞在体外培养一定时间，收集由于细胞的代谢更新，释放到培液中的膜蛋白。

3) 免疫共沉淀。 在有严格对照实验的条件下，在专一的抗免疫球蛋白沉淀系统(如兔抗小鼠免疫球蛋白的抗血清和未标记的小鼠免疫球蛋白)中，选择地沉淀^{125}I-标记的膜蛋白成分(包含膜结合的免疫球蛋白的免疫共沉淀物)。

4) 分析。 将专一的免疫共沉淀物溶解在9M尿素溶液内，经过还原和烷基化后，再在酸性尿素溶液中作聚丙烯酰胺凝胶电泳，并测量其放射性分布图形。和标准的各类重链、轻链的电泳迁移率对比，确定其性质。

2. 淋巴球表面免疫球蛋白的分离和鉴定结果

Marchalonis实验室应用上述方法系统地研究了小鼠和人的各类淋巴球，包括胸腺、脾脏、胸导管以及白血病瘤细胞。早期工作发现小鼠和人的B淋巴球表面的主要免疫球蛋白含有轻链和μ链，分子量约为200,000。从人类慢性淋巴白血病瘤细胞(B细胞)分离出的膜结合免疫球蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析指出，完整的Ig分子的电泳迁移率略慢于IgG分子(图13-6，上方)；经过还原的多肽链的迁移率相当于μ链和L链(图13-6，下方)。因此，可能是以IgM单体形式在膜上存在。从(CBA×C57) F_1杂种小鼠脾脏淋巴球分离的表面免疫球蛋白，含有迁移率上近似L链，μ链，以及少量的γ链成分(图13-7)。不过，后来的实验提示这些少量的γ链可能来自附着到细胞上的分泌抗体(Marchalonis, 1975)。

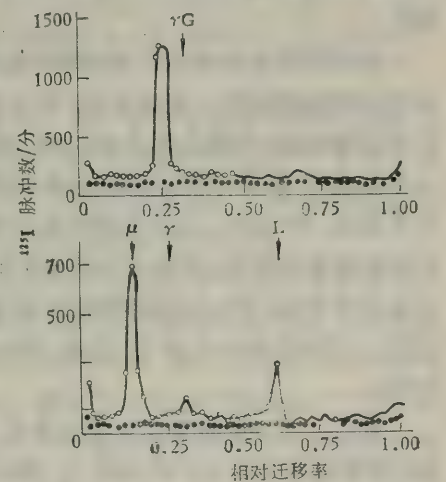


图 13-6 人慢性淋巴白血病细胞(B淋巴球)^{125}I标记的表面免疫球蛋白之聚丙烯酰胺电泳分析。(上图)未还原的免疫球蛋白分子，凝胶浓度5%。(—○—)专一沉淀的免疫球蛋白。(…)对照沉淀系统。γG：人标准γ-球蛋白(150,000 daltons)的迁移位置。(下图)经2-巯基乙醇还原的重链和轻链，凝胶浓度10% μ, γ, L示μ链，γ链和L链迁移的位置。^{125}I标记表面免疫球蛋白用非离子型表面活性剂 Nonidet P-40 溶解(Marchalonis, 1975)。

由于正常小鼠脾脏细胞是B细胞和T细胞的混合物，不能清楚地说明问题。因此，后来又选用从先天性无胸腺小鼠(nu/nu)的脾脏和胸导管淋巴球（T细胞夹杂<1%）作材料，结果发现从这些B细胞的表面膜上可以分离出两类免疫球蛋白（图13-8）。一类从电泳迁移率和抗原性证明含有μ链，分子量测定指出可能为IgM单体。另一类迁移较快的重链(分子量约为65,000)，电泳迁移率和μ链、γ链都不同，抗原性和糖含量也不同，可能相当于δ链（Marchalonis，1975）。一些学者先前曾发现小鼠B淋巴球表面还存在IgM以外的另一类免疫球蛋白，经初步鉴定可能是IgD（Melcher等，1974；Abney和Parkhouse，1974；Vitetta和Uhr，1975）。和IgM的性质不同，IgD的δ链很容易被酶解，这也许可能是在早期研究工作中没有被发现的原因。总结起来，现有的材料表明B淋巴球表面免疫球蛋白的主要形式是类似IgM单体，在某些B淋巴球还可能存在另一类免疫球蛋白IgD。

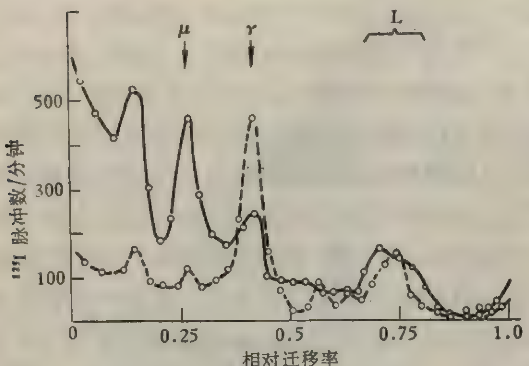


图13-7 酸性尿素内圆盘电泳对从(CBA×C57Bl)F_1小鼠脾脏淋巴球分离的免疫球蛋白多肽链的分析。(—○—)表面经过碘化的淋巴球在培养液内，37℃保温3小时。培养液内所含的释放的免疫球蛋白被专一地共同沉淀，电泳以前沉淀在9*M*尿素内还原和烷基化。(--○--)脾脏淋巴球分泌的免疫球蛋白的多肽链。部分培养液重新碘化并专一地共同沉淀。沉淀物在9*M*尿素内还原和烷基化。共同沉淀的标准免疫球蛋白多肽链的位置标记μ、γ、L分别为：μ链，γ链和L链(据Marchalonis等，1973)。

用同样的方法研究T淋巴球，包括被蛋白质抗原或细胞抗原专一地激活的周沿T淋巴球和T淋巴瘤细胞，结果发现T细胞表面膜上只存在一类免疫球蛋白(图13-9)。这种免疫球蛋白的分子量近200,000，是由典型的轻链和有些类似μ链的重链构成的。不过这种重链无论在抗原性、电泳迁移率和Fc的功能特性方面都和μ链有区别，可能代表一类新的重链（Marchalonis，1975）。

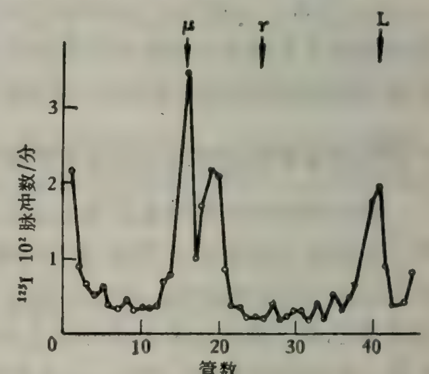


图13-8 先天性无胸腺小鼠（突变nu纯合子）脾脏B淋巴球表面免疫球蛋白经还原和^{125}I标记后之聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，缓冲液含SDS。免疫球蛋白用对κ链专一的免疫吸附剂分离。μ、γ和L指小鼠μ、γ和轻链在凝胶电泳中移动的位置。表面免疫球蛋白用非离子型表面活性剂Nonidet P-40溶解(据Marchalonis，1975)。

最近，同一实验室用免疫电镜术（扫描和透射）观察到纯化的抗小鼠IgG之$(Fab')_2$片段的鸡抗体能和豚鼠T淋巴球内源合成的膜成分结合。这提供了T淋巴球表面存在和Ig有关的膜抗原的直接证据（Marchalonis等，1978）。

3. 分离的淋巴球表面免疫球蛋白的结合专一性

虽然从淋巴球表面可以分离出免疫球蛋白，但要肯定这些膜结合的免疫球蛋白就是抗原受体，还需要证明它们对抗原确有结合专一性。

(1) B 淋巴球

已知先天性无胸腺小鼠 (nu /nu) 之未经免疫的 B 细胞群中，大约 1% 的细胞能和 DNP-血红蛋白专一地结合。从这些细胞代谢释放的，或经过有限制酶解从细胞表面分离出来的免疫球蛋白，同样地也能和 DNP 半抗原结合，并且这种结合能被抗免疫球蛋白的抗血清共同沉淀专一地去除 (Rolley 和 Marchalonis，1972)。

(2) 激活的 T 细胞

Marchalonis 认为 CBA 小鼠体内被羊红血球或血蓝朊激活的 T 辅助细胞能代谢释放类似 IgM 的表面免疫球蛋白，并且这些分子还能和相应的抗原专一地结合。此外，似乎还有证据指出激活的 T 细胞释放的免疫球蛋白能和巨噬细胞表面亲合，而 B 细胞释放的表面免疫球蛋白则不能亲合 (Marchalonis 和 Cone，1973；Cone，1974)。

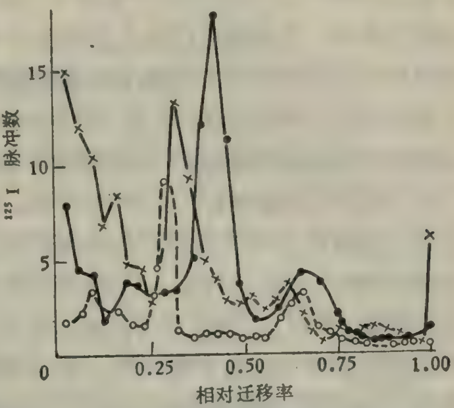


图 13-9 从小鼠胸腺淋巴球表面免疫球蛋白的 ^{125}I 标记多肽链和纯化的 IgM 和 IgG 免疫球蛋白多肽链在酸性尿素内圆盘电泳的比较。CBA/H/WEHI 小鼠胸腺细胞在离体条件下被 BALB/c 组织相合性抗原激活。(—×—) 激活的胸腺细胞的表面免疫球蛋白 (c.p.s.)；(—●—) 小鼠 IgG 多肽链 (c.p.m.$\times 10^{-2}$)；(—○—) IgM 髓细胞瘤免疫球蛋白 (c.p.s.$\times 10^{-1}$)。标准多肽链的相对迁移率：轻链 0.55—0.75，γ 链 0.40—0.48，μ 链 0.27—0.33。所有样品均为专一地共同沉淀物，并在 gM 尿素内经还原和烷基化(据 Marchalonis 等,1972)。

Marchalonis 通过系统的工作证明从 B 细胞表面分离的免疫球蛋白，表现出对抗原的结合专一性，因而可能就是膜上的抗原受体。同时，也有一些证据提示至少某些 T 细胞(辅助细胞)表面也可能存在类似 IgM 的抗原受体，不过其重链和 μ 链在结构和功能上都有不同。Marchalonis 还根据从激活的 T 细胞分离的免疫球蛋白对巨噬细胞有亲合力，进一步推测这种分子可能就是参与 T 和 B 细胞协同作用的中介因子，并称之为 IgM (T)。不过后一看法没有得到普遍的承认。

除上述实验室的工作外，其他许多实验室用类似的方法也证实 B 细胞表面存在 IgM 抗原受体。然而，从胸腺细胞或激活的 T 细胞都不能证实有免疫球蛋白存在，因而怀疑 T 细胞表面抗原受体可能不是免疫球蛋白 (Lisowska-Berstein 等，1973；Parkhouse 和 Abney，1972；Vitetta 和 Uhr，1975)。总之，综合各方面的材料看来，对于 B 细胞表面抗原受体是免疫球蛋白的结论是一致的，而对 T 细胞表面抗原受体的性质则存在分歧的意见，至今尚无定论。

(三) T 细胞表面抗原受体的性质问题。Ir 基因产物和抗原识别构造的关系。

如上所述，虽然 Nossals，Marchalonis 实验室的工作提示 T 细胞抗原受体可能是类似 IgM 的免疫球蛋白，但是没有得到其他实验室的证实。目前，多数免疫学家倾向于认为 T 淋巴球表面没有自己合成的任何一类免疫球蛋白，也没有存在 κ 或 λ 轻链的可靠

证据。

从七十年代起，几方面的研究工作结果影响了对T细胞抗原受体的性质的看法。首先注意到的是，和B淋巴球不同，T淋巴球的功能特点在于识别主要组织相容性基因复合物（MHC）及其变异的产物并与之起反应。其次，它们对通常的胸腺依赖性抗原（蛋白质和多肽）的免疫反应能力受到位于MHC区域内的一系列的Ir基因的控制。免疫遗传学研究发现和主要组织相容性基因座连锁的免疫反应（Ir）基因能制约T细胞对抗原反应的能力（Benacerraf 和 McDevitt，1972）。由于Ir基因主要表现在T细胞表面，以及H-2抗血清能抑制T细胞功能，因而推测T细胞的抗原受体可能和Ir基因产物有关系（参看十五章503页）。另一方面，有证据表明对同一个抗原决定簇反应的T、B淋巴球之抗原结合部位有同样的或相似的个体型（Idiotype）（Binz 和 Wigzell，1975；Eichmann，1973，1975），也就是说两类淋巴球对同一抗原决定簇的受体分子具有共同的易变区（V区）。由此还可以进一步推论，两类淋巴球可能是用共同的V基因来建造它们的抗原受体的结合部位的。根据这些资料，有人设想T细胞抗原受体可能是一个既和Ig部分相似，又和H-2抗原部分相似的复合构造，也可能是具有类似Ig的V区和I-区基因产物的C区的复合分子（Galley 和 Edelman，1972；Greaves，1975）。

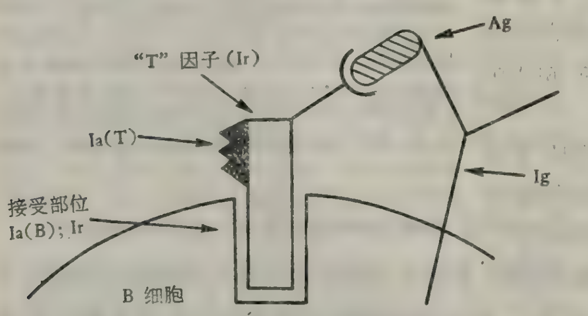


图 13-10 抗体反应中的细胞相互作用的示意图，表示抗原、专一的T细胞因子和B细胞接受部位间的相互作用。 Ia：当用抗I-区抗血清检测时T细胞因子显示的抗原决定簇。 Ir基因是T细胞因子和B细胞接受部位的编码基因（据 Munro 和 Taussig，1975）。

最近，发现激活的T淋巴球能释放抗原专一的T细胞因子，介导T细胞对免疫反应的调节（促进或抑制）作用。有人认为T细胞产生的这类专一的因子很可能就是细胞本身表面上的识别分子。因此，对于这些因子的性质和结构的研究可能对于解决T细胞受体问题有重要意义。根据目前初步了解到的，T因子具有下述特性：具有抗原结合专一性；分子量约为40,000—60,000；没有免疫球蛋白重链或轻链C区的抗原决定簇，而具有Ia抗原决定簇（Paul 和 Benacerraf，1977）。这些具有Ia抗原决定簇的分子和具有抗原结合专一性的Ig重链个体型决定簇分子的关系如何，还不清楚。

这里特别要提到 Taussig 和 Munro（1975 a, b）的一个实验。他们发现小鼠对(T, G)-A-L抗原的免疫反应是受位于MHC的I-区的两个不同功能的基因控制的。一个基因控制T细胞对抗原的识别和产生细胞协同作用因子；另一个基因控制B细胞对T细胞因子的反应（参看第十五章，504页）。某些品系的小鼠对(T, G)-A-L没有反应，可能是由于T细胞的遗传缺陷，不能产生对此抗原专一的"T"因子，而另一些遗传上无反应能力的品系，则是由于B细胞缺少接受此"T"因子的接受分子，或两者都缺乏。当把遗传上T细胞缺陷的小鼠和B细胞缺陷的小鼠交配时，F_1子代便能恢复对此抗原的反应能力。作者的解释是由于I-区基因互补的结果，并由此推论，I—区可能包含有T和B细胞表面识别分子（具Ia抗原性的糖蛋白分子）的结构基因。这些糖蛋白分子可能不仅

对抗原识别有关系，而且和T,B细胞以及巨噬细胞间的识别有关系（图13-10）。如果这一看法是正确的，I-区基因产物不仅和T细胞的抗原受体有关系，而且和免疫活性细胞间相互识别系统也可能有关系。这就向分子免疫学提出了又一个需要深入细致研究的重要课题。

三、淋巴球的激活

淋巴球通常在没有受到外界刺激时，停顿在分裂静止期(早G1期)，功能上不活跃。当B淋巴球表面的抗原受体和专一的抗原结合时，便触发一系列复杂的反应，使基因选择地激活，导致细胞的增生、分化和专一抗体的合成。B淋巴球被抗原选择地激活是抗体生物合成的关键步骤。鉴于抗体反应的专一性，一般认为抗原决定簇和B淋巴球表面抗原受体的相互作用在这一触发机制中起主导作用。不过，B细胞表面其他膜构造和辅助细胞(T细胞和巨噬细胞)产生的专一因子的相互作用也可能参加作用。实际上，一个有免疫反应能力的B细胞的抗体反应是包括激活和调整的多步骤的复杂过程，受到专一的抗原信号和其他免疫细胞的调节信号以及激素的影响(图13-11)。因此，应当区分哪些信号是初级信号，哪些是次级信号；什么是始发反应，什么是继发反应。

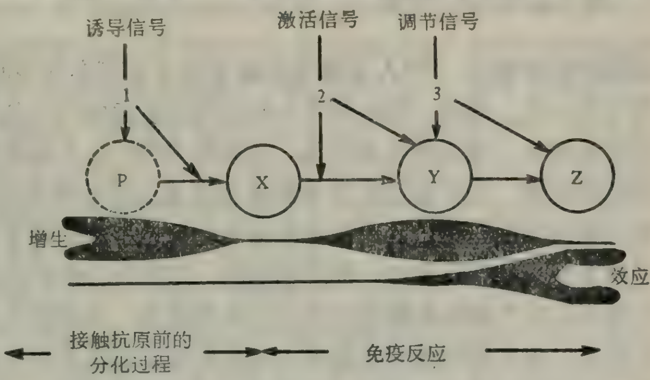


图13-11　淋巴球生命史中接受的信号和反应。诱导信号：胸腺或法氏囊（相当的器官)的诱导因子诱导干细胞向T、B淋巴球及其亚群方向分化。激活信号：主要为抗原本身。调节信号：T细胞产生的辅助因子或抑制因子，抗原抗体和C3复合物，激素等（据Greaves, 1975)。

除抗原能专一地触发淋巴球的免疫反应外，还发现一些非专一的物质，如植物血球凝集素、细菌内毒素、脂多糖等也能触发T或B细胞群中相当大的一部分细胞进行分裂活动。这类物质因而被称为有丝分裂原（Mitogen)。有丝分裂原对两类淋巴球的作用是有选择性的。植物凝集素，如刀豆凝集素（ConA)、植物血球凝集素（PHA）等能专一地激活T细胞，使它们增生、转化并释放各种和细胞免疫有关的介导因子。另一方面，美洲商陆有丝分裂原（Pokeweed mitogen）和细菌脂多糖（LPS）等能选择地激活B淋巴球增生、分化成浆细胞，并分泌IgM抗体（Parkhouse 等，1972；Anderson 和 Melcher，1973)。不过，这样产生的一些抗体的结合专一性可能是多种多样的，并且和原用来激发的有丝分裂原本身的抗原性可能没有关系（Anderson 等，1972)。因此，这一类物质又被称为多株B细胞分裂原（Polyclonal B cell activator，简称PBA)。PBA对B细胞的作用是直接的，不需要辅助细胞（T细胞、巨噬细胞)的参加。常见的许多PBA同时又是不依赖胸腺的抗原。或者，更确切地说，不依赖胸腺抗原的载体部分具有内在的多株B细胞分裂原的性质(表13-2)。由于各种各样抗原结合专一性的B

表 13-2 常见的多株 B 细胞激活因子和不依赖胸腺抗原

多株 B 细胞激活因子	不依赖胸腺抗原
脂多糖（LPS）	脂多糖（LPS）
肺炎球菌多糖 SIII	肺炎球菌多糖 SIII
多聚体鞭毛素（POL）	多聚体鞭毛素（POL）
果聚糖	果聚糖
葡聚糖	葡聚糖
美洲商陆有丝分裂原（PWM）	—
某些 KLH 制品	某些 KLH 制品

（据 Coutinho 等，1975）。

细胞都能被激活，PBA 显然和抗原受体之间不存在空间互补关系，或者说这种激活信号是不专一的。然而，这种非专一的信号和抗原的专一信号都能导致共同的结果：B 细胞的形态转化、增生和合成抗体。这说明 PBA 对 B 细胞的激活作用可能通过和抗原某些共同的机制，并可能反映 B 细胞激活始发过程的某些方面。一般抗原只能激活淋巴细胞群中极少数的细胞，因此很难直接研究抗原引起的膜变化和分裂的发动过程；有丝分裂原却能够激活相当大的一部淋巴细胞，这就为分析研究提供了方便。因此，通常把有丝分裂原对淋巴细胞的激活当作一个实验模型，来帮助我们分析和了解抗原对淋巴球的激活机制。为了使问题简化起见，这里只限于讨论有丝分裂原对淋巴球激活的一个初期阶段，即分裂的发动。同时，主要讨论 B 细胞的激活，有时也提到 T 细胞。这两类淋巴球在分裂发动机制的主要方面是相似的（Greaves 和 Janossy，1972）。

（一）淋巴球的激活是一个细胞表面现象

激素对效应细胞的作用机制可以作为研究信号-受体-基因激活系统的一个借鉴。

已知激素对体细胞的作用机制存在两种方式。一种方式，如某些甾体激素（孕酮）直接进入靶细胞，和细胞质内专一的受体蛋白结合后，再进入细胞核，选择地激活基因的功能活动。另一种方式，多肽或蛋白质激素（如升血糖素、胰岛素等）和效应细胞膜上的受体

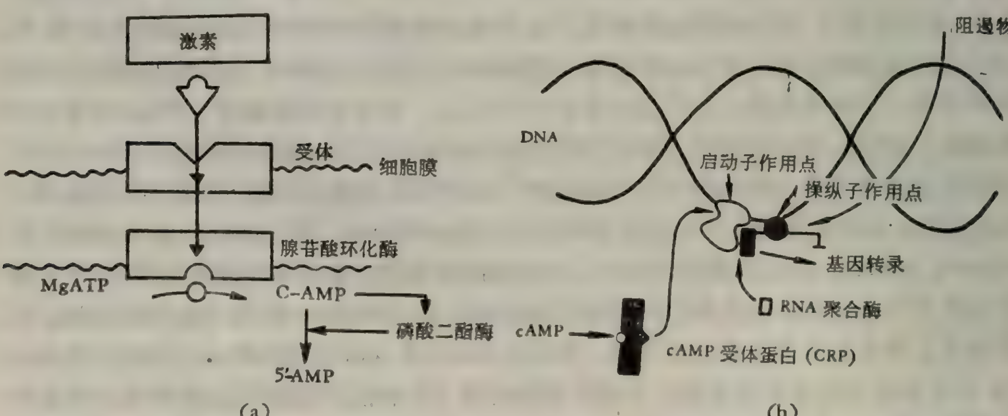


图 13-12 多肽激素对效应细胞的作用机制。(a) 激素作用于膜受体，导致次级信号 (cAMP) 的产生。(b) cAMP 调节基因的转录（借用 E. coli 模型）（据 Greaves, 1975）。

专一地结合，激活膜上的腺苷酸环化酶，产生环化腺苷酸（C-AMP）作为次级信号，选择地激活基因，而导致专一的激素效应（参阅 Sutherland 和 Robinson，1966；Greaves，1975）（图 13-12）。

参照上述激素对效应细胞作用机制的概念，抗原（或有丝分裂原）和淋巴细胞表面受体结合，如何触发细胞的增生、分化，理论上同样可能存在这两种作用方式。已知 B 淋巴球对溶解的 PHA 无激活反应。然而，当把 PHA 和琼脂糖珠共价连接，形成固相复合物时，便能刺激 B 细胞增生。可溶性 PHA 是 T细胞专一的，而固相 PHA 却能激活 B 细胞。这一事实有力地说明固相 PHA 对 B 细胞的刺激作用不是由于从琼脂糖珠上掉下来的可溶性物质引起的。（Greaves 和 Bauminger，1972；Anderson 等，1972）。同样地，当把半抗原共价连接到固体颗粒表面（如 TNP-KLH-琼脂糖珠、TNP-聚丙烯酰胺珠），这样得到的不溶的半抗原，也能在离体条件下，激活 B 细胞的 IgM 抗体反应（Feldman 等，1974）。这些观察提示有丝分裂原和半抗原很可能直接作用于细胞表面。不过也不能完全排除它们既产生膜效应，又有少数分子通过饮液作用进入细胞内起作用的可能性。既然 B 淋巴球激活的始发机制可能主要是一个膜现象，于是，便可以提出问题：受到抗原刺激时细胞膜内发生了什么变化？膜内的变化又如何通过细胞质传回细胞核内，选择地激活基因，发动分裂和分化？其次，既然非专一的信号（PBA）和专一的信号（抗原）都能激活 B 淋巴球，这就提出了一个激活信号的本质问题：非专一信号和专一信号的关系如何？B 细胞对抗原的反应中存在单一信号，还是双重信号？我们将依次在下面讨论这些问题。

（二）淋巴球激活时细胞膜的变化、相关的和继发的反应

淋巴球的激活是专一的抗原或非专一的有丝分裂原和细胞表面受体相互作用的结果。这种相互作用立即触发细胞膜内以及和膜相关的广泛的变化（膜的流动性和磷脂代谢增加、阳离子和代谢物转运加强、环核苷酸酶活力增加等），并且迅速反映到细胞核内（染色质组蛋白乙酰化）。同时，在形态上可观察到细胞表面受体聚集成簇，并向细胞一端移动，形成"极冠"。稍后，核酸代谢有关的酶活力增加，RNA 和蛋白合成增加。直到 48—72 小时后，DNA 开始合成，从而导致细胞分裂。由于淋巴球激活时细胞膜的变化出现很早，又几乎是同时发生的，很难确定其发生的先后和因果关系。这里先对这些变化作现象上的描述，然后再作分析讨论。

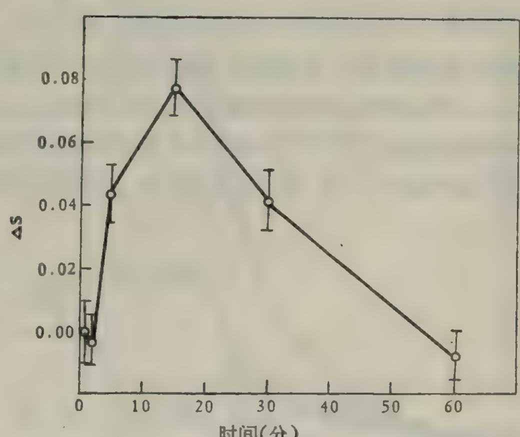


图 13-13 小鼠脾脏淋巴球加有丝分裂原 ConA（3 微克/毫升）后不同时间对细胞膜流动性的影响。$\Delta S = S_{对照} - S_{con}A$，$S_{对照} = 0.52$。当 S 值→1 时，类脂膜相当于晶态，而 S→0 时相当于液态（据 Barnett 等，1974）。

1. 细胞膜磷脂代谢和流动性的改变

淋巴球激活的早期反应之一是细胞膜内磷脂(如磷脂酰肌醇等)的代谢率增高(Fisher 和 Mueller, 1968)。PHA 刺激淋巴球 10 分钟后，也观察到^{14}C-油酸参入细胞膜的卵磷脂增加三倍以上(Resh 等, 1972)。有人用电子顺磁共振(自旋标记)法，观测到淋巴球受到有丝分裂原刺激的几分钟内，细胞膜的流动性就开始增加，15—30 分钟达到顶峰(图 13-13)。值得注意的，膜流动性变化的时程正好和细胞内 cGMP 和 cAMP 水平涨落的时程大体上是平行的。其次，各种植物凝集素中，只有那些具备有丝分裂原活力的(如 PHA, Con A 等)才能使膜流动性增加，而不具有丝分裂原活力的(如 WGA)则不能，并且即使是前者，也只有在能发动分裂的有效浓度才能引起膜流动性的变化。这提示膜流动性变化和分裂的发动可能有密切关系(Barnett 等, 1974)。

2. 阳离子(Ca^{++}, K^{+})转运的加强

淋巴球激活的早期过程中出现的另一个膜现象是阳离子通透性增加。

(1) 钙离子

虽然淋巴球激活时各种膜现象出现的先后顺序和因果关系，还难于确定，有许多证据表明 Ca^{++}起着重要的作用。在加 PHA 后不久，Ca^{++}流入量便迅速增加(Whitney 和 Sutherland, 1973; Allwood 等, 1971)，并且钙离子的螯合剂(EGTA, EDTA)能可逆地抑制 PHA 诱发的淋巴细胞的转化(Alford, 1970; Whitney 和 Sutherland, 1973)。已知一种抗生素 A 23187 是专一的双价离子载体(Ionophore)。它是一种低分子量的单盐基的羧酸。当两个分子和双价阳离子形成一个脂溶性复合物时，易于穿过细

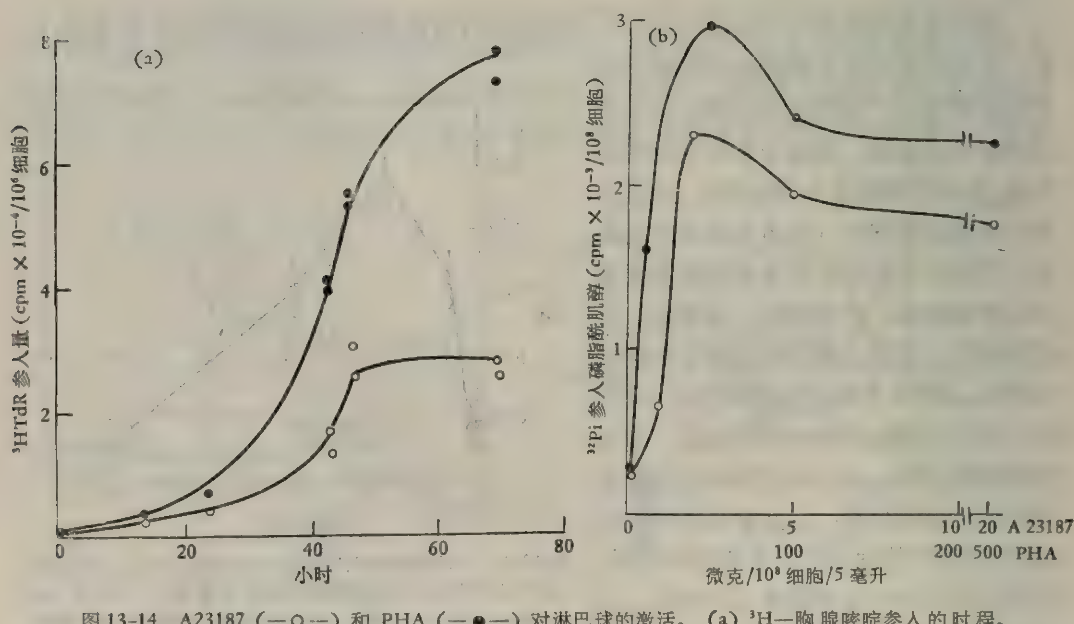


图 13-14 A23187 (—○—) 和 PHA (—●—) 对淋巴球的激活。(a) ^{3}H—胸腺嘧啶参入的时程。(b) 对磷酯酰肌醇代谢率加强的剂量作用曲线(据 Crumpton 等, 1975)。

胞膜。当用 A 23187 处理淋巴球时，便能引起和 PHA 引起的一样的变化，并且这些变化的进程大体上是平行的(图 13-14)。 因此，这一实验有力地提示 Ca^{++}通透性的增加和淋巴球激活可能有直接的关系。 Ca^{++}流入量或细胞内 Ca^{++}水平的增高是淋巴球激活的必要兼充分条件（Maino 等，1974；Crumpton 等，1975；Quastel 等，1975）。

（2）钾离子

初期研究发现淋巴球被有丝分裂原激活的头几分钟内，^{42}K 的流入量迅速增加。细胞膜上 K^+,Na^+-ATP 酶的专一抑制剂——箭毒苷（Quabain）能可逆地抑制有丝分裂原对淋巴细胞的激活，而外界 K^+浓度升高能减小或抵销箭毒苷的抑制作用，并且还观察到各种有丝分裂原引起的 ^3H-胸腺嘧啶摄入量和^{42}K 流入量的剂量反应曲线是相似的。有人认为这些事实提示有丝分裂原可能激活细胞膜 K^+,Na^+-ATP 酶，增加细胞内 K^+流入量和 Na^+排出量，并且由于细胞内 K^+水平的增高可能触发促使 DNA 合成的代谢过程（Averdunk 和 Lauf，1975；Quastel，1975）。

然而，用原子吸收法直接测量 Con A 刺激时淋巴细胞内 K^+含量的变化，却发现细胞内 K^+的量迅速而持续地降低，而 Na^+并不发生补偿性升高（Negendank 和 Collier，1976）。因此，目前只能说 Con A 刺激能改变淋巴球 K^+通透性，不过其结果是K^+流入量或流出量增多就不清楚了。

缬氨霉素（Valinomycin）是一种短肽抗菌素，能形成环状结构，其羰基上的氧指向环的中心，形成“穿膜孔道”，被转运的 K^+离子可与之结合，通过构象变化而将 K^+离子通过膜运入细胞内。最近，有人发现缬氨霉素能抑制 PHA 刺激的淋巴细胞的增生转化，并且这种抑制作用可被增加外界 K^+离子浓度所阻止（Daniele 和 Holian，1976）。这一实验似乎提示有丝分裂原对淋巴球的激活作用可能涉及影响膜电位变化和离子通过膜的转运。

（3）淋巴球激活过程中阳离子作用的顺序性

利用专一的螯合剂（EDTA 对 Ca^{++}，O-二氮杂菲对 Zn^{++}）或 K^+,Na^+-ATP 酶抑制剂(箭毒苷)分析淋巴球被有丝分裂原激活各时期对阳离子的要求，得出阳离子起作用的顺序如图 13-15 所示。从图上可见，有丝分裂原和淋巴球表面结合的触发作用本身(步骤 1)似乎并不需要这几种阳离子。和其他两种阳离子不同，Ca^{++}离子只是在刺激后几小时内(步骤 2)是必需的。如果在细胞经 PHA 处理 12 小时后，再加 EDTA 去除

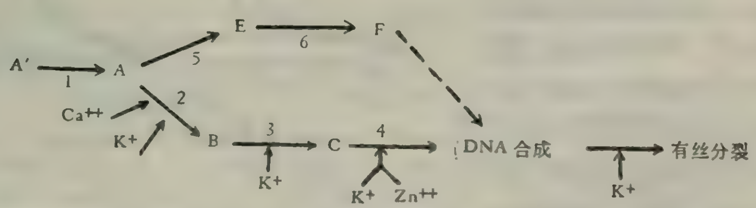


图 13-15 淋巴细胞激活中阳离子作用的时间顺序。 步骤 1：有丝分裂原和细胞膜结合的触发作用。 步骤 5 和 6：触发后不久发生的对箭毒苷不敏感的 RNA 合成。步骤 2，3，4：激活状态 A 和 DNA 合成发动之间的一连串中间过程(据 Kaplan 和 Quastel，1975)。

Ca^{++}，对淋巴球转化就不再会起抑制作用了。早期激活过程不需要 Zn^{++}，O-二氮杂菲不抑制蛋白质或 RNA 合成，而完全抑制晚期才开始发生的 DNA 合成（步骤 4）。箭毒则抑制全过程。除去第 1 步和 5、6 步骤外，所有步骤都需要 K^+离子（Kaplan 和 Quastel，1975）。

3. 环式核苷酸

已知环式核苷酸（cAMP 和 cGMP）是哺乳类细胞生长、分化和功能活动的细胞内调节物。细胞生命活动的许多矛盾过程，如分裂的发动和抑制、糖原的合成和分解等，都可能受细胞内 cAMP 和 cGMP 浓度的相对变化调控（Kolata，1973）。例如离体培养的成纤维细胞受到生长因子刺激而增生、分裂时，细胞内 cGMP 水平迅速升高，而 cAMP 水平却很少变化。反之，加前列腺素 PGE_1 时，细胞内 cAMP 水平升高，而细胞的 DNA 合成和分裂却受到抑制。因此，一般认为 cGMP 似乎可能作为细胞生长调控的正信号，而 cAMP 可能作为负信号（Rudland 等，1974）。

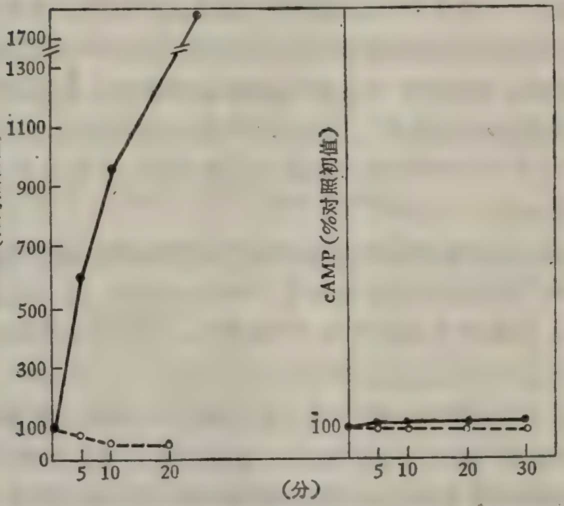


图 13-16 高度纯化的植物血凝素制品 PHA—MR69（3 微克/毫升）（—●—）对淋巴细胞 cGMP（左图）和 cAMP（右图）浓度的影响（—○—）对照(据 Hadden 等，1972)。

对于免疫系统，Hadden 等（1972）最先观察到当用 Con A 和 PHA 处理淋巴细胞，20 分钟内细胞里的 cGMP 水平升高 10—50 倍，而 cAMP 水平则维持不变（图 13-16）。因此，同样可以假定淋巴细胞激活时，cGMP 的暂时升高可能作为诱导增生的正信号，而 cAMP 的升高则可能起调节或限制分裂的作用。如果这一假定是对的，外加 cGMP 或其衍生物，就应和 ConA 一样，刺激淋巴细胞的 RNA 和 DNA 的合成。实验结果证明确系如此（图 13-17）（Weinstein 等，1974）。Watson（1974，1975）还证明 B 细胞有丝分裂原 LPS 同样能刺激小鼠脾脏细胞内 cGMP 迅速而短暂的升高。然而，能提高细胞内 cGMP 水平的因素（如 Carbachol），并不一定就能刺激细胞分裂。有证据表明细胞不是对 cGMP 的绝对水平的变化

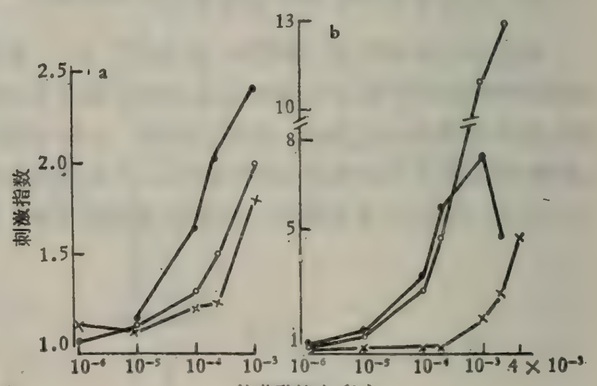


图 13-17 不同浓度的鸟苷 3′，5′-环核苷酸［(-×-) cGMP；(—●—) 二丁基环-GMP；(—○—) 8 溴环 GMP］对 ^3H 尿嘧啶(a) 和 ^3H 胸腺嘧啶 (b) 参入 TCA 沉淀的大分子部分之刺激作用。刺激指数(纵坐标)为环核苷酸处理组和未处理组之比值(据 Weinstein 等，1974)。

起反应，而是对细胞内 cAMP 和 cGMP 比值的变化起反应。这些证据是，检查培养的分裂细胞和不分裂的细胞时，发现虽然细胞内cAMP，cGMP 的绝对含量可能各不相同，可是不分裂细胞和分裂细胞有很明确的区别。不分裂细胞的 cAMP/cGMP 比值总是高一些，而分裂细胞就低很多（Rudland等，1974）。另一方面，培养的脾脏细胞加 cAMP 就可以抑制 LPS 诱导分裂的作用。由于在加 cAMP 时细胞内原有的 cGMP 水平可认为维持不变，而 cAMP/cGMP 比值可预料应有所上升（Watson，1974)。因此，认为细胞内 cAMP/cGMP 比值的变化可能是调节分裂的发动的信号。B 细胞有丝分裂原的共同作用可能是引起细胞内 cGMP 水平升高而使 cAMP/cGMP 比值降低，从而导致细胞分裂的发动（Watson 等，1973；Watson，1975）。

4. 微管和微丝

淋巴球表面 Ig 或其他受体被专一的双价抗体交叉连接后，发生移动，先是簇集成片，然后聚集到细胞的一端，形成“极冠”(Taylor 等，1971）该作者还曾经认为这一现象和淋巴球的激活有关系。（参看第四章，114页）。Edelman（1974）实验室发现这种细胞表面受体的移动能被 Con A 抑制。天然的 Con A 是四聚体(四价)，其衍生物琥珀酰-Con A 是二聚体(二价)。这两种分子在低浓度时都能刺激淋巴球增生。可是，天然 ConA 在高浓度时反而不能刺激增生，却能抑制细胞表面受体的移动和“极冠”形成。琥珀酰-ConA 即使在高浓度仍能刺激增生，同时并不抑制受体的移动。已经和琥珀酰-ConA 结合的淋巴球，如果再用抗-ConA抗体处理时，受体的移动又受到抑制。由此可见，受体移动的抑制是和受体被广泛地交叉连接有关系，并且“极冠”形成和淋巴球的激活之间并不存在 Taylor 曾经设想的那种因果关系。

进一步实验分析还发现，秋水仙碱、长春花碱和长春新碱等破坏细胞微管的药物能解除 ConA 引起的细胞表面受体移动的抑制(图 13-18；图 13-19)。此外，还有人发现受体移动和“极冠”形成受对松胞素（Cytochalasin B）敏感的构造——微丝控制（de

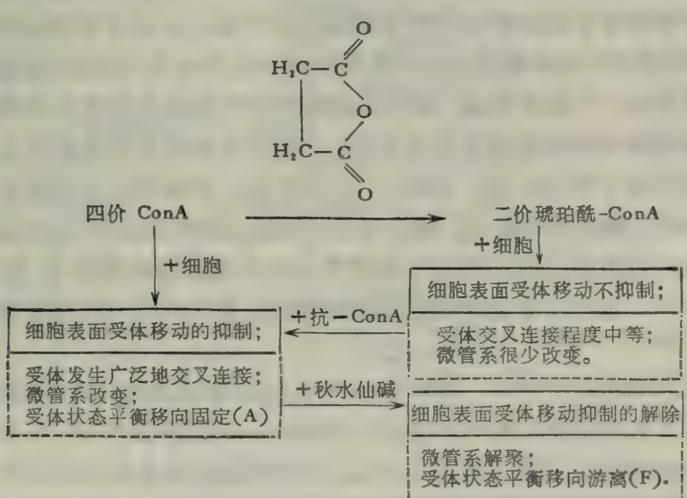


图13-18 ConA 或琥珀酰-ConA 和小鼠脾脏淋巴球结合对细胞表面受体状态的影响。加抗 ConA 抗体到和细胞表面结合的琥珀酰-ConA 可模拟 ConA（四价)的效应。秋水仙碱能逆转 ConA 和琥珀酰-ConA 加抗-ConA 的效应(据 Edelman，1974)。

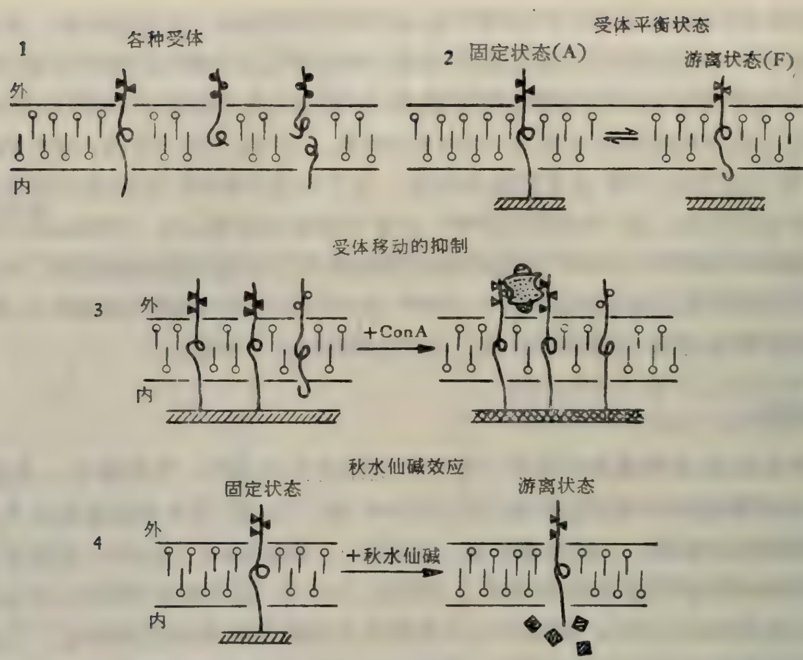


图 13-19　细胞表面受体和微管系的相互作用，以及 ConA 和秋水仙碱对这种相互作用的影响。(1) 各类受体：一些受体可能穿过细胞膜的脂双层，直接地或间接地和细胞质内微管系相互作用，另一些受体可能停留在膜内或膜上。(2) 前一类受体和微管系的相互作用可能处于固定状态 (A) 和游离状态(F)的平衡中。　(3) ConA 和 ConA 受体的交叉连接可能导致微管系的变化，并影响其他受体 A⇌F 平衡，连带地使全部受体转入固定态。　(4) 秋水仙碱使微管系统解离成亚基，结果使 A⇌F 平衡逆向移动(据 Edelman, 1974)。

Peteris 和 Raff，1973)。这些事实提示淋巴细胞表面各种受体可能直接地或间接地和细胞膜下的微管和微丝系统相互作用，它们可能固定在微管和微丝系统上，或处于不固定的游离状态。各种配位基(有丝分裂原、抗原、抗体等)和受体的交叉连接都可能改变这种相互作用，影响微管系统的解离和聚集状态间的平衡，从而调节受体的固定、游离和移动。利用和固相颗粒(琼脂糖珠、血小板)共价连结的 Con A 作的实验还指出，Con A 只需和淋巴球表面的一小部分结合，就足以抑制整个细胞的全部受体的移动。这就是说 Con A 和细胞表面的一部分受体交叉连接时，一部分受体固定到微管系上就能连带地使全部受体转入固定态（Wang 等，1976）。另一方面，还发现秋水仙碱能抑制有丝分裂原（Con A）对淋巴球分裂的发动。动力学分析指出这种抑制作用发生在加 Con A 的早期，并且可能和有丝分裂原的触发过程有关，而不是影响晚期的有丝分裂的进行（Wang 等，1976）。这些发现提示细胞质微管(微丝)系统在调节细胞分裂的发动中，可能起重要作用。

根据上述各方面的实验事实，Edelman 等人提出假说，假定淋巴细胞表面各类受体都可能固定在膜下的由微管和微丝构成的共同骨架——细胞表面调节系统（Surface Modulating Assembly，简称 SMA）上面。这种细胞表面调节系统既可能控制细胞表面受体的移动，同时又能控制对外源信号(有丝分裂原的触发信号)的反应，并且是连接细胞表面变化和对分裂刺激的反应的中间环节。有丝分裂原和淋巴球表面受体结合而产生的分裂刺激可能是通过这种调节系统起作用的（Wang 等，1976；Cunningham 等，

1976)。

5. 细胞核内的激活过程

细胞核的激活最先从染色质上的蛋白的变化中表现出来。Mirsky 实验室早就发现淋巴球受到 PHA 刺激时，几分钟内染色质上的组蛋白（主要是"富精氨酸"组蛋白）的乙酰化迅速增加，继之核内的 RNA 合成也增加(图 13-20)（Pogo 等，1966)。另一方面，和染色质缔合的蛋白的磷酸化也相当迅速地增加（Kleinsmith 等，1966)。后来对细胞核内三种主要的核蛋白成分的研究发现，在 PHA 刺激后酸性蛋白最先合成和磷酸化，其次是可溶性核蛋白。组蛋白的合成要在 24 小时才增高（图 13-21）（Pogo 和 Katz，1974)。随着组蛋白乙酰化的进行，几种 RNA 聚合酶活力也逐次增加，RNA 合成也相继进行。对淋巴球分离的细胞核的研究表明，PHA 处理 15 分钟时，RNA 聚合酶 I（核仁)的活力便开始增高。RNA 聚合酶 II（核液）活力，1 小时后开始增高，6 小时内继续上升，24 小时后又下降。RNA 聚合酶 III 要到 48 小时才观察到有微弱的增加（图 13-22)（Pogo，1972)。目前一般认为组蛋白及其他和染色质缔合的蛋白的乙酰化和磷酸化是基因激活的重要标志。通过乙酰化和磷酸化，使组蛋白或其他核蛋白和 DNA 的相

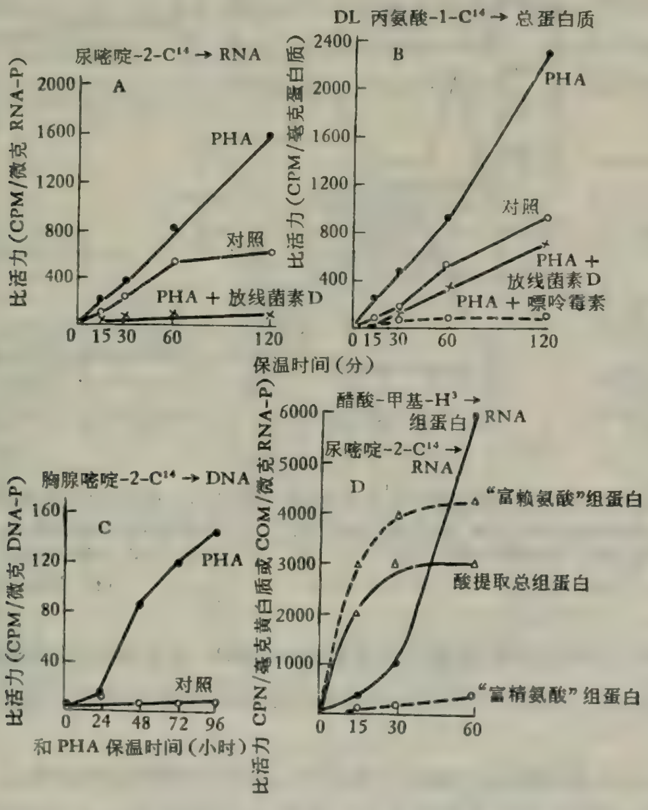


图 13-20 PHA 对人外周淋巴球之 RNA、DNA、蛋白合成及组蛋白乙酰化的影响。(A) 对照和 PHA 处理细胞 RNA 合成的时程，示放线菌素 D 的抑制影响。(B) 蛋白合成的时程，示 PHA 的刺激作用，嘌呤霉素的抑制影响，及放线菌素对 PHA 诱发的蛋白合成峰的抑制。(c) PHA 处理的淋巴球 DNA 合成的时程。(D) 总组蛋白和电泳纯化部分之乙酰化的时程，和同一细胞群 RNA 合成的时程的比较(据 Pogo 等，1966)。

互作用减弱，便于 RNA 聚合酶或其它专一的基因调节物和 DNA 起作用，并开始基因的转录活动。

细胞化学研究也支持这种看法。应用显微萤光光度计测量吖啶橙（AO）和 DNA 核蛋白的结合，也观察到淋巴细胞在加 PHA 后几分钟内，萤光染料和染色质的结合点非常迅速地增加；并且如果在 PHA 刺激的早期不出现 AO 结合值的增加，就不会发生淋巴细胞的转化。因此，AO结合值的早期升高似乎也反映了基因激活所必需的染色质细微结构的变化和染色质上 RNA 转录的地点（Killander 和 Rigler，1969；Frenster，1971）。

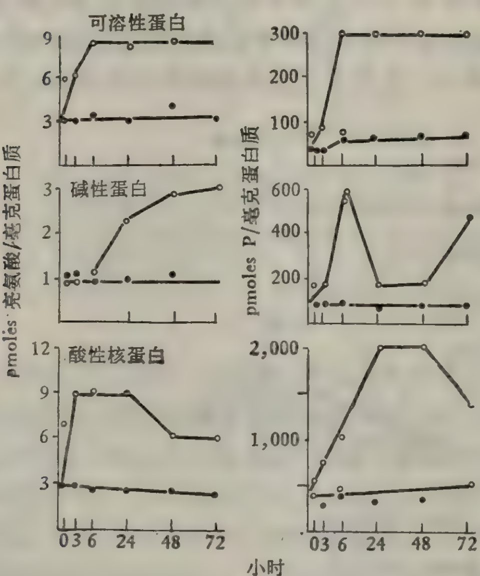


图 13-21 PHA 刺激和对照的人淋巴球核蛋白的合成和磷酸化。(—○—) PHA处理的淋巴球；(-●-)未处理的淋巴球；(—◑—) PHA 处理的淋巴球加嘌呤霉素（据 Pogo 和 Katz，1974）。

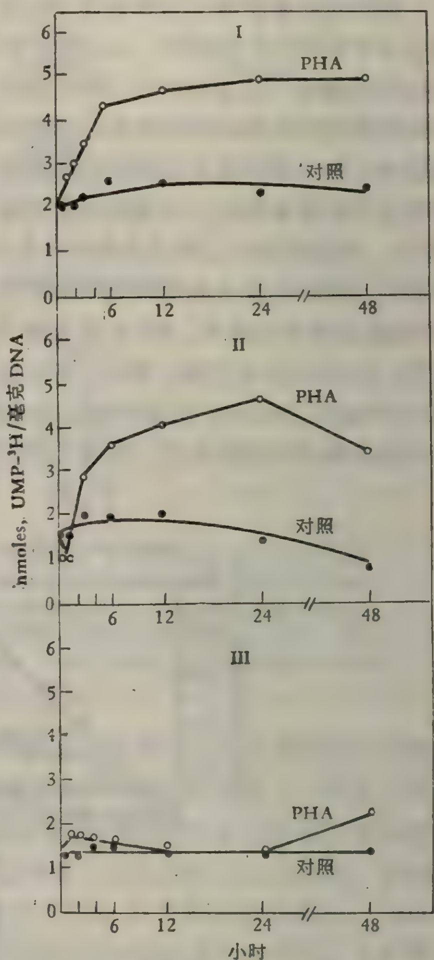


图 13-22 淋巴球分离的细胞核经 PHA 处理不同时间后 RNA 聚合酶（I, II, III）的活力。(—○—) PHA 处理的细胞；(—●—) 对照细胞（据 Pogo，1972）。

值得注意的，已知环化核苷酸（cAMP 或 cGMP）有刺激组蛋白磷酸激酶的作用。因此，有丝分裂原对淋巴球激活的早期，cGMP 水平的迅速增高很可能和核内的激活过程有关系。

至于 DNA 合成要在较晚时期才开始发生。³H-胸腺嘧啶脉冲参入实验表明，DNA 合成要在加 PHA 后 24 小时才开始升高，大约 60 小时达到一个平而宽的坪值（Pogoraro 和 Bernengo，1971）。DNA 聚合酶活力的增加（30—150 倍）是和 DNA 合成的增加平行的。胸腺嘧啶激酶和胸腺嘧啶磷酸激酶活力也有增加（2—10 倍），而另一些含量较高的激酶（如脱氧鸟苷一磷酸激酶，鸟苷一磷酸激酶等）则不增加。

PHA 诱发的这些酶活力的增加似乎依赖新 RNA 的合成。当用放线菌素 D 抑制 RNA 合成时，DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激酶以及胸腺嘧啶一磷酸激酶的合成也受到抑制，DNA 合成也因而停顿。然而，这并不影响淋巴球形态上的转化。因此，淋巴球形态上的转化似乎不依赖新 RNA 合成和 DNA 的复制。反之，DNA 合成则必须 DNA 聚合酶的合成（Loeb 等，1970）。

此外，淋巴球激活过程中，核膜孔的变化也是值得注意的。PHA 刺激后 48 小时，每一细胞核的核膜孔的数目大约增加一倍。这种增加呈现双相性：第一相似乎和蛋白合成的增加有关系；第二相似乎和核酸合成的增加有关系。这提示核膜孔既可能是核质交通的孔道，又可能是 DNA 复制的起点（Maul 等，1972）。

总之，淋巴球激活的始发机制是有丝分裂原（或抗原）和细胞膜受体的结合（交叉连接）而触发的膜现象。这种结合刺激触发的原初反应经过在膜内的传播和放大，传递到细胞质内引起广泛的代谢变化，再经过未知的信号导致细胞核内基因的激活和分裂的发动。有人把淋巴球激活时相伴发生的生化现象，根据已有的证据或设想可能存在的因果关系，初步绘制了一个流程图，抄录在这里供进一步讨论的参考（图 13-23）（Cooper，1975）。

虽然淋巴球激活时各种膜现象及相伴行的生化过程十分复杂，其出现顺序和因果关系还难于确定，有证据表明细胞内钙离子的流入量和 cGMP 水平的升高起着重要的作用。这二者显然又是和膜的结构和功能的变化有密切关系的。现在就这几方面的关系作一些分析讨论。

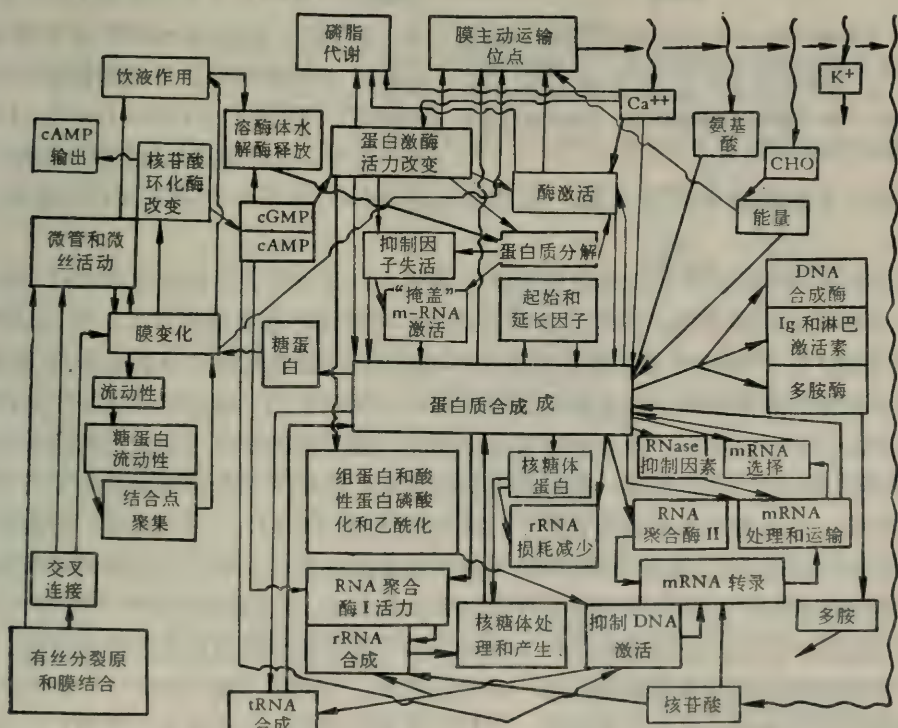


图 13-23 与淋巴球激活相伴发生的生化现象的流程图（据 Cooper，1975，修改）。

先谈膜的变化。淋巴球激活时和膜有关的许多生化过程几乎同时地和广泛地发生，因此需要假定有丝分裂原和细胞膜受体相互作用触发的原初变化在膜内有一个传播和放大的机制。曾经有人假定淋巴球激活早期膜内磷脂代谢的改变可能起这种作用。由于膜内磷脂代谢率增加，导致膜的理化性质的广泛改变，结果造成膜的流动性和功能的改变（Ca^{++}流入量增加、核苷酸环化酶的激活等）（Resh 和 Ferber，1975）。然而，近来有证据表明Ca^{++}载体 A 23187 能和 PHA 同样地刺激淋巴细胞的增生和膜磷脂酰肌醇代谢率的增加（图 13-14，b）。这说明膜磷脂代谢率的升高依赖Ca^{++}浓度的升高，而不是磷脂代谢率的升高引起Ca^{++}流入量的增加。

Ca^{++}离子是对细胞功能活动有广泛意义的调节因子。激素、神经递质等都可能通过改变细胞内Ca^{++}流入量或Ca^{++}在细胞内不同区域之间的分布而起作用。细胞分裂有关的许多过程也受Ca^{++}控制。根据"晶格镶嵌模型"，生物膜的脂质是处在由无序（"流动态"）到有序（"晶态"）的相变中。这种相变受到Ca^{++}离子的调节影响。Ca^{++}离子可使含有各种磷脂的膜结构出现分相作用——晶态和液晶态分开，从而影响膜的流动性。其次，Ca^{++}离子和 cGMP 也有密切关系。在一些细胞，已知细胞内 cGMP 水平可能受Ca^{++}离子调节。缺钙时，细胞内 cGMP 水平降低，同时细胞对刺激 cGMP 升高的因素（如乙酰胆碱等）不能起反应（Schultz 等，1973）。另一方面，几种能增加细胞内 cGMP 水平的调节因子也能增加Ca^{++}流入量。这些事实说明Ca^{++}离子和 cGMP 间存在复杂的相互作用。

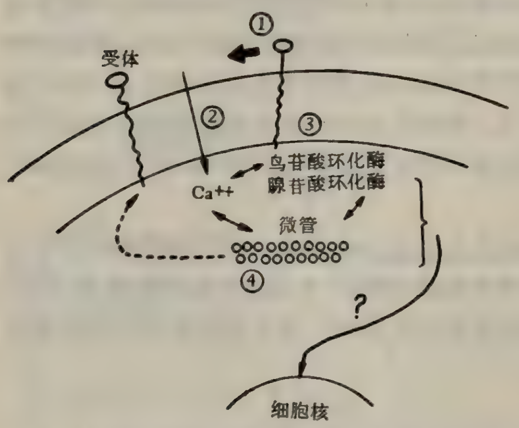
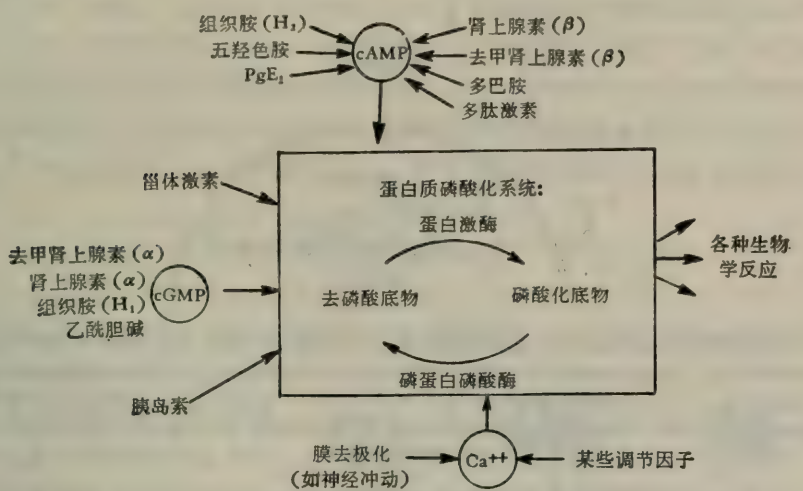


图 13-24 总结淋巴球被有丝分裂原激活的早期过程中细胞膜调节系统各成分相互作用的示意图。① 受体的移动和固定；② Ca^{++} 的转运；③ cGMP 和 cAMP 环化酶系的激活；④ 微管系的解离和聚合。从膜到核的最近的信号还不清楚（据 Wang 等，1975）。

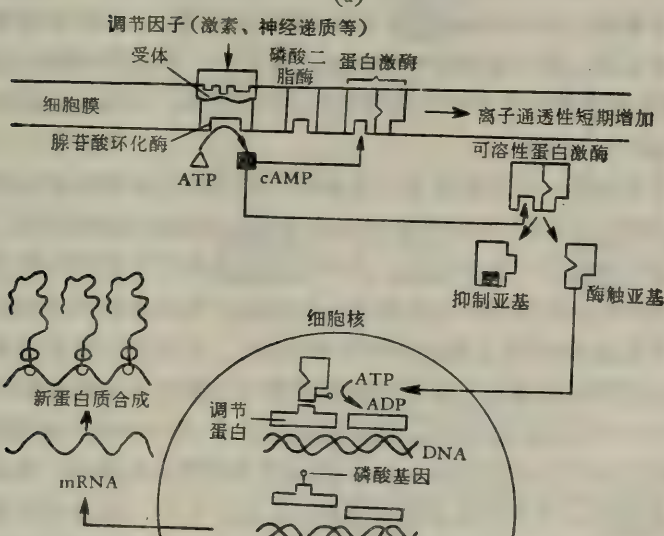
虽然目前对淋巴球激活的始发机制还不清楚，从上述可以肯定细胞内Ca^{++}离子的流入和 cGMP 水平的升高，在有丝分裂的发动中可能同时起着重要作用。例如，A23187（钙离子载体）和 Phorbol 酯（提高细胞内 cGMP 水平）都能起发动分裂的作用。此外，它们又都能对植物凝集素的分裂刺激起加强作用。这提示它们三者可能通过一个共同的途径，殊途而同归地起作用。有人假定有丝分裂原和膜受体的结合可能通过细胞表面调节系统（微管和微丝）的相互作用，引起膜蛋白的流动，造成酶亚基或膜蛋白的聚合状态或构象的变化，形成离子通道和核苷酸环化酶的激活（图 13-24）。另一方面，细胞核内染色质蛋白的迅速变化（乙酰化和磷酸化）可能反映基因的激活。剩下的问题是从膜的变化到核内基因的激活，最直接的信号是什么，又如何传递，这仍然是有待于弄清楚的地方。在深入讨论这一问题前，需要先谈一下神经递质和激素作用机制研究的最新成果。

对神经递质和激素作用机制的进一步研究发现，cAMP（或 cGMP）的作用方式是和细胞质内蛋白激酶的抑制亚基结合，引起构象变化而和酶的活性部分脱离，从而使蛋白激酶激活。激活的蛋白激酶再进入细胞核内，把 ATP 上的一个磷酸转移给和染色质

上的基因紧密贴近的核内调节蛋白。 核内调节蛋白由于磷酸化，发生构象变化而与DNA双螺旋脱离，从而使基因得以按既定的程序进行转录活动，导致新的mRNA和蛋白质的合成，并表现出专一的生物学效应(图13-25b)。 因此，蛋白激酶可看作是激素作用产生的 cAMP (或 cGMP) 和与激素的生物学效应有关的基因激活过程之间的连结环节。此外，Ca^{++}离子也可能通过刺激细胞内蛋白质的磷酸化而起特定的生理作用。不



(a)



(b)

图 13-25 调节因子(甾体激素、多肽激素、神经递质和 Ca^{++} 等)对靶细胞的作用机制。(a) 各种调节因子通过对蛋白质磷酸化系统的影响，而引起各种生物学效应。 (b) 调节因子 (如多肽激素)和细胞膜受体结合，激活腺苷酸环化酶，导致次级信号 (cAMP) 的产生。 cAMP 再激活细胞质内的可溶性蛋白激酶。后者再进入细胞核，把 ATP 的一个磷酸基团转移给和染色质上的基因紧密联合的核内调节蛋白。核内调节蛋白由于磷酸化，发生构象变化而和 DNA 双螺旋解离，基因开始按既定程序进行转录活动，导致新的 mRNA 和蛋白质的合成 (据 Greengard, 1978; Nathanson 和 Greengard, 1978)。

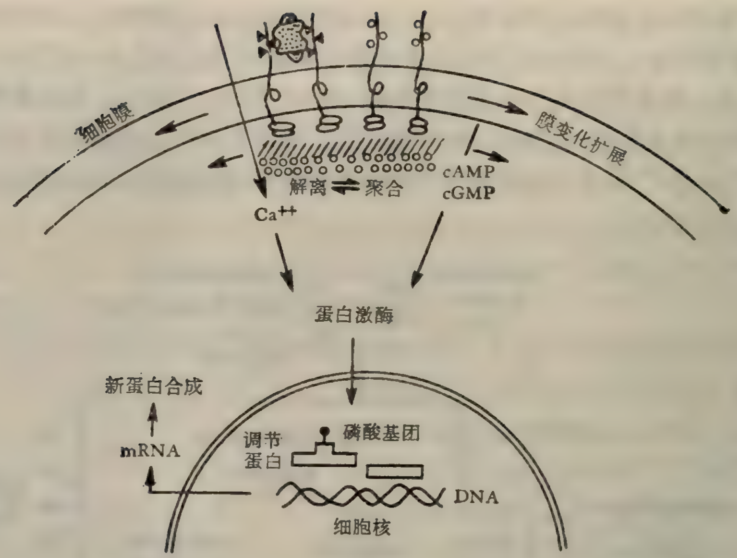


图 13-26　B 淋巴球激活的机制。(1) 抗原或非专一的配合基(有丝分裂原、抗体)和膜受体结合通过共同的细胞表面调节系统 (SRA)的相互作用,引起一系列膜变化,并在膜内传播、扩大,结果核苷酸环化酶激活,Ca^{++} 流入量增加。 (2) Ca^{++}流入量增加或(和) c AMP/cGMP 比值降低, 使细胞质内蛋白激酶激活。(3) 蛋白激酶进入细胞核,使核内基因按既定程序激活(染色质调节蛋白的磷酸化和乙酰化增加),淋巴球开始增生和分化。

过,依赖 Ca^{++}的蛋白质磷酸化可能和依赖 cGMP (或c-AMP) 的蛋白质磷酸化是通过不同的蛋白质激酶起作用的。总之, 各种调节因子(激素、神经递质和 Ca^{++})虽然作用的初始过程可能不同, 都可能通过一个共同的环节——蛋白质磷酸化系统, 激活靶细胞核内的基因,而各自发挥其特定的生物学效应(图 13-25a) (Greengard, 1978; Nathanson 和 Greengard, 1978)。

根据上述概念, 可以设想蛋白激酶很可能是从有丝分裂原触发的淋巴球的膜变化(Ca^{++}流入量和 cGMP增加)到核内基因激活之间的最直接的环节。各种有丝分裂原和淋巴细胞表面受体结合 (交叉连结) 都可能通过这些受体固着在其上的细胞表面调节系统(微管和微丝)的相互作用, 引起膜蛋白的流动, 酶亚基或其它膜蛋白构象或聚合状态的变化, 结果造成 Ca^{++}流入量和 cGMP 的增加。 这些因子的变化又可能通过共同的环节——蛋白质磷酸化系统, 使核内的基因激活 (染色质上调节蛋白的磷酸化和乙酰化), 并开始增生和分化(图 13-26)。 这一假说填补了 Edelman 等的假说的空白, 并可以方便地解释淋巴球激活早期过程中的主要事件 (膜受体和微管、微丝系统间的相互作用、Ca^{++}流入量增加, 核苷酸环化酶的激活) 的相互关系, 以及单独提高细胞内 Ca^{++} 离子水平 (A23187 处理)或 cGMP 水平 (Phorbol 酯处理) 都能使淋巴球激活的事实,并且还能把这些膜变化和观察到的核内激活过的早期事件(核内调节蛋白的乙酰化和磷酸化)连结起来。

三、B 淋巴球激活的几种假说

上述淋巴球被有丝分裂原激活的一些实验资料和理论解释可能作为 B 细胞被抗原

激活机制的重要借鉴。然而，这种模型是过于简化了，不能提供 B 细胞被抗原激活中真正起作用的受体、信号的性质和数目以及调整影响等方面的知识。B 细胞的激活是包括抗原的专一结合，以及细胞（T、B 和巨噬细胞）间的相互作用的远为复杂的过程。同时，B 细胞在受到抗原刺激发动分裂后，还要经历一个增生，分化的阶段，才能最后成为一个成熟的合成和分泌抗体的浆细胞。B 细胞受到抗原刺激后的反应有两种可能性：诱导产生抗体或耐受性。此外，一些抗原不依赖 T 细胞就能刺激 B 细胞产生抗体，而另一些抗原则必须依赖 T 细胞。关于 B 细胞被抗原激活机制的合理的假说必须能圆满地解释这些现象。其中几个主要的问题是：受体的性质、信号的性质和数目（单一信号或双重信号），而关键问题是受体和膜转换机制的关联，即抗原和受体的结合如何转换为激活信号，又如何传回核内使基因激活。根据对这些问题的不同解释，提出了几种不同的假说。这里先对 B 细胞激活的本质作一般地讨论，然后再简略地介绍几种主要的假说。

（一）B 淋巴球激活过程的本质。"多型反应"。

亚显微形态、生化等方面的研究表明，B 细胞对专一抗原或非专一配合基(有丝分裂原，抗 Ig 抗体等)的反应过程是大致相似的。因此，B 淋巴球的激活本质上是一个触发过程（图 13-27）（Greanes 和 Janossy，1972）。激活的初始机制可能是非专一的，而细胞的专一反应(具有特定的抗原专一性和基因记号的抗体合成）是由既定的基因型及基因活动程序决定的。无论细胞表面哪一个或哪几个受体被专一的抗原或非专一的配合基(有丝分裂原、抗体)结合(交叉连接)所产生的触发信号，都可能通过"次级信号"和一个共同的通路使核内基因选择地和按顺序地激活。目前，还不能完全断定抗原引起的触发信号是和哪一种或几种受体(或膜构造)有关系。同样地，这种触发信号的性质也还不太清楚。根据前一节的分析，各种配合基（专一的和非专一的）和膜受体的结合（交叉连接）都可能通过它们共同固着在其上的细胞表面调节系统(微管和微丝)，引起一系列的膜变化（Ca^{++}流入量增加、cGMP 增加等)。假定这些变化都可能和次级信号有关系。不论这

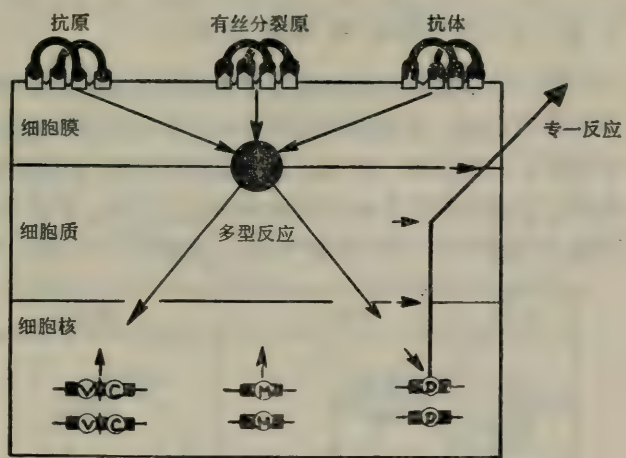


图 13-27　淋巴球激活的简单模型。

配合基：抗原和类似免疫球蛋白的细胞表面受体结合；
有丝分裂原和细胞表面的糖蛋白结合；
抗体和细胞表面膜抗原（ALS）结合。
基因选择地激活：
(V—C)免疫球蛋白重链和轻链的易变区和不变区基因；
(M) 构成抗体和有丝分裂原结合位点的膜成分的结构基因，其中一些为淋巴球专一的；
(D) 控制表型反应的去抑制或激活的"分化"基因。
反应：多型的，大多数或所有激活细胞共同的，包括细胞膜、细胞质和核内的变化；
专一的，一定类型细胞特有的（如 B 细胞合成 Ig)。
（据 Greaves 和 Janossy，1972)。

些次级信号的起源或性质如何，它们都可能传递到细胞内部引起共同的一系列生化反应(组蛋白乙酰化和磷酸化增加、基因转录和转译，糖酵解增高，细胞表面特性变化等)，其中大多数为生长活跃的细胞所共有，称为“多型反应”（Pleiotypic response）。这些反应之间的因果关系还不很清楚。根据前一节的分析，同样可以假定各种次级信号可能通过一个共同的途径——蛋白质磷酸化系统引起“多型反应”。于是，从B细胞被抗原触发到分裂发动的过程都可能用有丝分裂原对淋巴球的激活模型加以解释。不过，B细胞被抗原激活的机制还有其特殊的问题需要考虑，这些问题包括激活过程中细胞间的相互作用，诱导抗体形成或耐受性，依赖胸腺抗原和不依赖胸腺抗原的作用，这就涉及受体的性质，触发信号的数目(单一或双重的)等问题。由于对这些问题的看法不同，目前对B淋巴球的激活机制存在几种不同的假说。

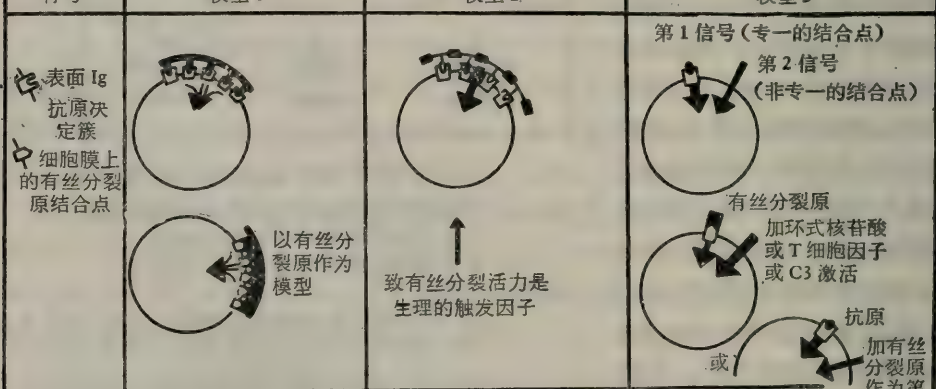
（二）关于B淋巴球激活机制的假说

B淋巴球被抗原（和多株有丝分裂原）激活的三种主要的理论模型如简图13-28所示。现将几种假说的要点介绍如下：

1. 单个专一信号假说(或“网架”假说)

这一假说强调抗原决定簇和B细胞表面专一的Ig受体的相互作用就足以触发淋巴球的激活过程，只要提供的抗原决定簇的空间排列能使Ig受体的交叉连结达到一定程度就够了。按照这一假说，不依赖胸腺抗原(如鞭毛素、LPS等)本身是有重复结构的多聚体，因而易于和B细胞表面受体交叉连结。T细胞的功能是能把非多聚体抗原集中排列在其表面形成一种“网架”构造，或者通过T细胞产生的亲合细胞的Ig T和抗原结合

符号	模型 1	模型 2	模型 3



激活方式	单一信号通过Ig	单一信号　通过非专一的（有丝分裂原）结合点	双重信号 通过 (1) Ig (2) 非专一结合点
不依赖胸腺抗原	多个决定簇重复排列	有丝分裂原	否认两类抗原有质的区别
依赖胸腺抗原	分子柔曲，决定簇密度低	无有丝分裂原活力	

图 13-28　B淋巴球被抗原和多株有丝分裂原激活的三种模型(据Greaves, 1975)。

后，排列在巨噬细胞表面形成一种“网架”构造提供给 B 细胞，并和 B 细胞表面 Ig 受体发生广泛地交叉连接。因此这一假说又称为“网架”假说（“Matrix” hypothesis）（Feldman 等，1973）（参看图 13-3）。这一假说最有力的证据是鞭毛素抗原的单体和多聚体在离体系统中诱导抗体的行为。不过，同一抗原系统在体内的实验结果与离体的实验结果有矛盾（Langman 等，1971）。

2. 单个非专一信号假说

这一假说主张 B 细胞的触发只需要一种非专一的(不涉及 Ig 受体的)信号。Ig 受体并不产生激活信号，而只是被动地起集中抗原到反应细胞表面上的作用。B 细胞的激活或产生耐受性依赖触发信号量的不同，而不是质的区别。B 细胞只有接受适当量的非专一的触发信号才能激活，过量就产生耐受性(免疫麻痹)（Coutinho, 1975；Coutinho 和 Möller，1974；Coutinho 等，1975；Möller，1975）。

支持这一假说的主要证据是：

1）多株 B 细胞分裂原（PBA）能对 B 细胞起非专一的激活作用。

2）已知所有不依赖胸腺的抗原（TI）也都是多株 B 细胞分裂原，即有直接诱导B细胞合成多株抗体的能力，而无需 T 辅助细胞的帮助。TI 抗原共有的激活能力是分子内禀的特性。

3）半抗原和依赖胸腺抗原（TD）载体偶联后不能在离体诱导抗体合成，即使所用的半抗原浓度改变 10^9 倍。然而，同一半抗原若和 TI 载体（LPS）偶联就能一致地诱导抗体反应。因此，抗体反应是否发生决定于载体的性质（TI 或 TD），而不是决定于抗原决定簇的密度。后者的作用仅在于促进和 B 细胞的结合，集中半抗原载体结合物。

4）既然专一抗半抗原反应的触发信号可能是由 PBA 载体发出的，加游离的 PBA 应能显著地影响抗半抗原反应。实验确实证明低于最适激活剂量的 LPS 能加强低浓度的 NNP-LPS 诱导的抗 NNP 半抗原抗体的专一反应。反之，半抗原-TD 结合物决不能和 LPS 起这样的协同作用。

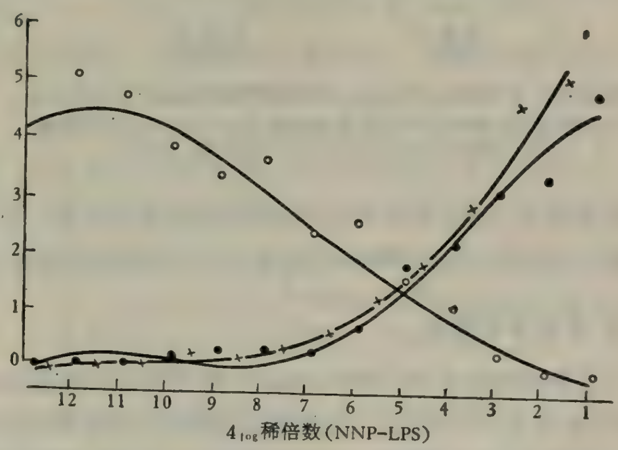


图 13-29 验证单个非专一信号假说的一个实验的结果。正常小鼠脾脏细胞在不同浓度 NNP-LPS（培养液内不加血清）中培养二天。测定 DNA 合成量及对无关抗原（SRC）的抗体的量。此外，还测量了对专一的 NNP 半抗原的高亲合力抗体的合成。(—×—) cpm/培养 (Y: 0到 84,000)；(—●—) 抗 SRC 空斑形成细胞数/培养 (Y: 0 到 300)； (—○—) 高亲合力抗 NNP 空斑形成细胞数/培养 (Y: 0 到 1,500)(据 Coutinho 等，1975)。

5）半抗原-LPS 结合物在低浓度(高稀释倍数)时，诱导专一的高亲合力的抗半抗原抗体(抗 NNP 抗体)，而在高浓度时就诱导多株抗体（包括对无关抗原 SRC 的抗体）的形成，并且完全没有专一的抗 NNP 反应(图 13-29)（Coutinho 等，1975)。如果将游

离的半抗原加到此免疫反应系统内，并不抑制专一的抗-NNP 反应，但是剂量反应曲线完全改观，只有在半抗原-LPS 结合物达到高浓度（引起多株抗体反应的浓度）才能有专一的抗半原抗体合成（Coutinho 等，1975）。因此，Möller 认为 LPS 载体是唯一的触发信号，Ig 受体只是被动地起集中半抗原载体结合物的作用。这和双重信号假说所假定的诱导半抗原抗体同时需要半抗原和载体触发的信号（信号 1+2）是不相容的。

这一假说能方便地解释多株 B 细胞分裂原对 B 细胞的非专一的激活作用。实际上这也是它的主要事实依据。在抗原诱导的专一的抗体反应中，Ig 受体只是起着把抗原集中到能对专一抗原反应的 B 细胞表面的作用。于是，具有对 TI 抗原决定簇专一性的 Ig 受体的 B 细胞便能选择地结合抗原。在抗原浓度低时，只有专一的 B 细胞能结合足够数量的有发动分裂能力的抗原分子，不过这种触发作用完全是靠 TI 抗原的 PBA 特性引起的。非专一细胞（缺乏抗原专一的 Ig 受体）在 TI 抗原浓度低时不能结合足够数量的抗原分子，因而不能被触发。然而，当 TI 抗原浓度增高时，非专一细胞也能结合足够数量的 TI 抗原，而触发非专一的多株抗体反应。此时专一细胞由于结合过多的 Ig 分子，反而发生耐受性（免疫麻痹）（图 13-30）。因此，诱导抗体合成或耐受性是由于触发信号量的不同，而不是由于质的区别。此外，这一假说能解释 T 辅助细胞产生的非专一因子的作用，但不能解释抗原专一的 T 细胞因子的作用（Taussig，1974）。

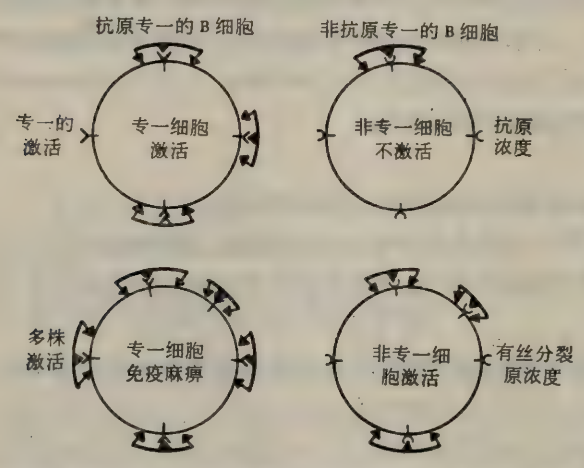


图 13-30 简图表示专一的 Ig 受体起集中抗原的作用，不依赖胸腺抗原（多株 B 细胞分裂原）表现双重作用。（—▲—）抗原决定簇；（⥉）致有丝分裂能力（据 Coutinho 等，1975）。

3. 双重信号假说

Bretscher 和 Cohn（1968）最先提出 B 细胞的激活需要双重信号。只有当 B 细胞的 Ig 受体先和抗原的半抗原决定簇相互作用（第一信号）之后，再接受另一个第二信号，才能被激活。这种第二信号可能是由于抗原的载体决定簇和 T 细胞相互作用产生的 T 辅助因子提供的。B 细胞如果只接受第一信号，而不和第二信号起作用，则导致耐受性状态。

Watson（1973，1975）进一步发展了这一假说。他认为 B 细胞的激活过程是受两个不同的受体位置的膜相互作用控制的。第一个受体位置和抗原的半抗原决定簇结合，第二受体位置接受 T 细胞信号，并各自产生细胞内介导物质——cAMP 和 cGMP。抗原和 B 细胞受体相互作用使膜内腺苷酸环化酶激活，细胞内 cAMP 水平增高，结果 cAMP/cGMP 比值增高。假定这一变化诱发负多型反应，导致细胞的失活（免疫耐受性）。另一方面，T 细胞信号和 B 细胞膜受体相互作用使鸟苷酸环化酶激活，细胞内 cGMP 升高，结果 cAMP/cGMP 比值降低。假定这一变化诱发正多型反应，导致 DNA

合成的发动，细胞的增生、分化和抗体的合成(图 13-31)。

这一假说能成功地解释半抗原-无免疫原性载体结合物能产生半抗原专一的耐受性现象（Katz 等，1974)。然而，这一假说不能解释不依赖胸腺抗原的作用，以及多聚体鞭毛素在离体系统诱导抗体反应和耐受性的剂量依赖关系（Diener 和 Feldman，1972)。

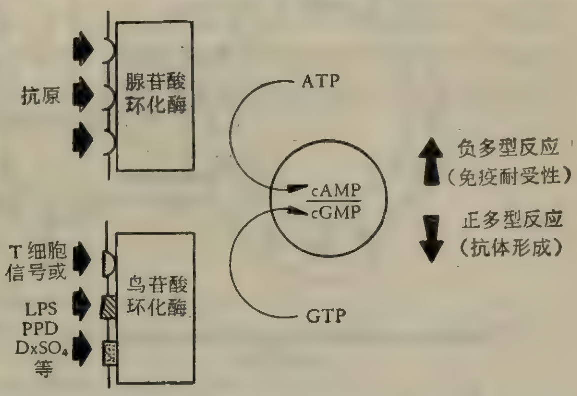


图 13-31　细胞内　cAMP/ cGMP 比值假定控制B细胞的两个预定程序的反应。免疫耐受性相当于一个负多型反应，而抗体合成的诱导则相当于一个正多型反应。抗原和细胞表面 Ig 受体相互作用激活腺苷酸环化酶。T细胞信号和各种非专一的B细胞有丝分裂原（LPS, PPD, Dx SO_4 等）和膜构造的相互作用直接地或间接地导致鸟苷酸环化酶的激活。细胞内 c AMP/c GMP 比值的增加发动负多型反应(免疫耐受性)，而比值的降低发动正多型反应(诱导抗体的形成)(据 Watson, 1975)。

4. “三重信号”假说

免疫反应中，从接受抗原刺激到抗体的合成和分泌，B细胞要经历一个增生和分化的过程。B细胞的增生和分化是两个性质不同的过程，有证据表明其发动可能受不同的信号控制。在无胸腺小鼠(nu/nu)的脾脏细胞（缺少T细胞）和异种红血球的离体初级免疫反应系统中，单独加抗原时可引起B细胞增生。但是，没有或很少能产生抗体的空斑形成细胞（PFC）出现（参看 434 页）。只有再加 T 辅助细胞或激活的 T 辅助细胞产生的一种非专一的因子（T 细胞代替因子，TRF）时，空斑形成细胞才大量增多。尤其特别的是，还发现 TRF 的最适作用时间是在B细胞和抗原接触后较晚的时间（24 到 60小时)，这时B细胞已经经历过若干周期的增生（图 13-32)。因此，这提示抗原虽然单独能刺激B细胞的增生，而B细胞的分化还需要T辅助细胞产生的非专一的信号来发动。也就是说，除去前述和发动分裂有关的两种信号以外，还存在和发动分化有关的第三种信号（Schimpl 和 Wecker, 1972; Dutton, 1975)。

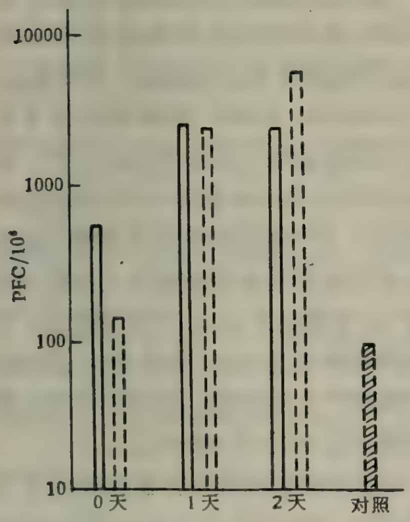


图 13-32　每 0.5 毫升含 1×10^7 nu/nu 脾脏细胞加或不加小牛血清离体培养。按指定时间加T细胞代替因子(不加小牛血清)。两天后，所有培养都加小牛血清，继续培养三天后计数空斑形成细胞（PFC）数目—— 加小牛血清，…… 不加小牛血清(据 Schimpl 和 Wecker, 1975)。

根据这些实验结果，Schimpl 和 Wecker (1975) 假定B细胞激活的全过程可分为三个阶段，分别受按顺序地起作用的三种信号控制：

阶段 1：抗原决定簇和B细胞表面Ig受体相互作用——“第一信号”，它本身并不能导致增生，而是使B细胞获得对后来的刺激起反应的能力；

阶段 2：B细胞表面的其他部分和“第二信号”（包括T细胞、巨噬细胞、激活的C3，

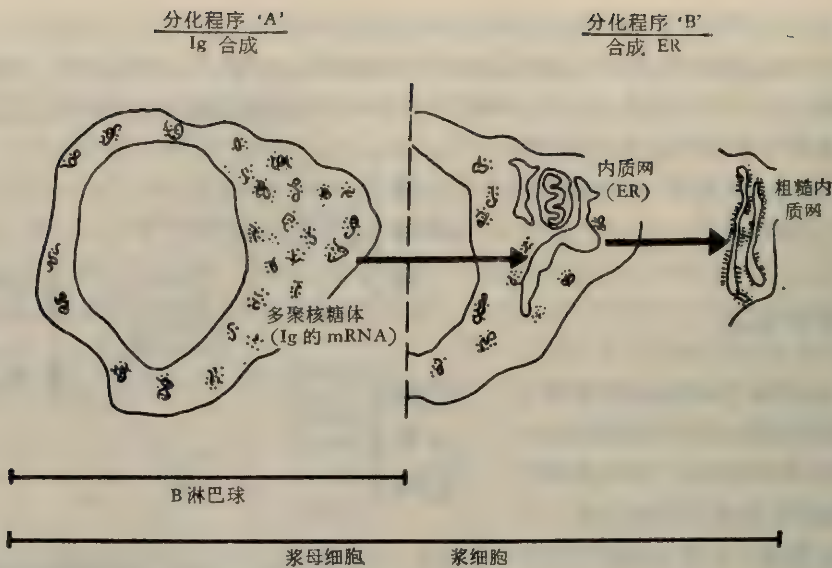


图 13-33 激活的 B 细胞的分化受两个不同的遗传程序控制的假说。(A) B 细胞激活的早期阶段，出现免疫球蛋白合成所需的信息(附着在多聚核糖体上的mRNA)。(B)后来发育出内质网膜成分，不同 B 细胞量上有不同。假定增生的 B 细胞，充分表现程序"A"，但并不一定进入终末细胞分化，而可能返转回去成为(寿命长的?) B 回忆细胞。如果 "A"，"B"两 程序都进行，这些细胞就变成寿命很短促的效应细胞(终末细胞)(据Ganossy 和 Greaves,1975)。

或 LPS 等)相互作用导致 B 细胞的增生。 如果某些抗原(不依赖胸腺抗原) 能同时提供信号 (1+2)，就能直接发动 B 细胞的增生。 此外，还可以设想，进入增生期(阶段 2) 的 B 细胞后来失去抗原，可能转变为记忆细胞。顺便提及，Janossy 和 Greaves (1975) 根据 LPS 对 B 细胞的早期激活过程的亚显微形态变化的分析，提出激活的 B 细胞的分化可能受两个不同的遗传程序控制的假说。处于增生阶段的 B 细胞，细胞质内分散着许多的游离的多聚核糖体，而粗内质网的发育程度低(完成程序 A)。这样的细胞，如果粗内质网得到继续发育(完成程序 B)，就变成短寿命的终末细胞——浆细胞，或者不能进行程序 B，就转变为回忆细胞(图 13-33)。

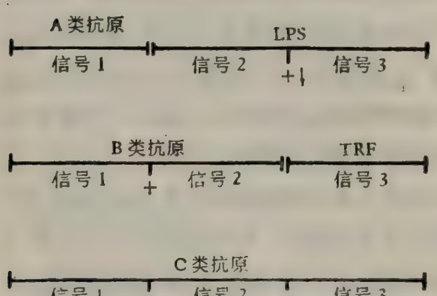


图 13-34 按照 B 细胞激活的"三重信号"假说，抗原分为三类：(A) 半抗原和只产生"信号1"的依赖胸腺抗原；(B) 能同时产生"信号 1+2"的依赖胸腺抗原； (C) 能产生三种信号的不依赖胸腺抗原(据 Schimpl 和 Wecker, 1975)。

阶段 3：当有足够量的抗原存在和进行几个周期的增生之后，还需要接受 T 细胞提供的"第三信号"，才能促进 B 细胞的分化，并活跃地合成和分泌抗体。

与此相应地，抗原按其本身固有的刺激 B 细胞增生和分化的能力，也可以区分为三种类型(图 13-34)。 至于"第三信号"的性质及其与 B 细胞作用的方式，都还不清楚。

总之，以上几种假说都各有其限制性，只能解释 B 细胞激活过程的某些方面。实际上，B 细胞的激活是包括 B、T 细胞及其亚群之间极其复杂的相互作用的现象。特别是 B

细胞对抗原的反应类型（产生抗体或耐受性）可能是受T辅助细胞和T抑制细胞相互拮抗作用的结果。另一方面，B细胞本身在功能上也是不均一的(组织分布、表面特性和增生能力等)，不同的亚群对触发信号的要求也可能是不同的（Janossy 和 Greaves, 1975)。如408页所述，T细胞对抗原的识别以及T、B细胞相互间的识别可能和细胞膜上的Ir基因产物有关系。这也说明了抗原和T、B细胞相互作用中受体和信号问题的复杂性。目前对淋巴球激活机制的上述几种假说都还是初步的理论模型，还有待进一步研究和发展。

参考资料

专著和论文集

Möller, G. (1972). Lymohocyte activaion by mitogens. Transplan. Rev. V. 11.

Möller, G. (1973). Lymphocyte immunoglobulin: synthesis and surface representation. Transplan. Rev V. 14.

Möller, G. (1975). Concepts of B lymphocyte activation Transplan. Rev. V. 23.

Nossal. G. J. V. and Ada. G. L. (1971). Antigens. lymphoid cells, and the immune response. Academic Press.

Oppenheim, J. J. and Rosenstreich, D. L. (1976). Mitogens in immunobiology. Academic Press.

Rosenthal, A. S. (1975). Immune recognition. Academic Press.

论文

Abney, E. R and Parkhouse, R. M. E. (1974). Candidate for immunoglobulin D present on murine B lymphocytes. *Nature* 252, 600.

Ada, G. L. (1970). Antigen binding cells in tolerance and immunity. Transplan. Rev. 5, 105.

Ada, G. L. and Byrt, P. (1969). Specific inactivation of antigen reactive cells with ^{125}I-labelled antigen. *Nature* 222, 1291.

Ada, G. L., Cooper, M. G. and Langman, R. (1973). The reaction of antigen with lymphocytes. In: "The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms", p. 532.

Andersson, J. Edelman, G. M., Möller, G. and Sjöberg, O. (1972). Activation of B lymphocytes by locally concentrated concanavalin A. *Europ. J. Immunol.* 2, 233.

Andersson, J. and Melchers, F. (1973). Induction of IgM synthesis and secretion in bone-marrow-derived lymphocyte by locally concentrated con-A. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) 70, 416.

Andersson, J. and Melchers, F. (1974). The differentiation of B cells by mitogens. Progr. Immunol., Vol. 1, Immunochem. Aspect. p. 127.

Alford. R. H. (1970). Metal cation requirments for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 104, 698.

Allwood, G., Asherson, G. L., Davey M. J. and Goodford P. J. (1971). The early uptake of radioactive calcium by human lymphocytes treated with phytohaemagglutinin. *Immunol.* 21, 509.

Averdunk, R. and Lauf, P. K. (1975). Effects of mitogens on sodium-potassium transport H-ouabain binding, and adenosine triphosphatase activity in lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 93, 331.

Barnett, R. E., Scott, R. E., Furcht, L. T. and Kersey, J. H. (1974). Evidence that mitogenic lectins induce changes in lymphocyte membrane fluidity. *Nature* 249, 465.

Bankhurst, A. and Warner, N. L. (1971). Surface immunoglobulin on mouse lymphoid cells. *J. Immunol.* 107, 368.

Benaceraff, B. and McDevitte, H. O. (1972). Histocompatibility-linked immune respone. *Science* 175, 273.

Binz H. and Wigzell, H. (1975). Sheared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. IV. Isolation of two groups of naturally occuring ideotypic molecules with specific antigen-binding activity in the serum and urine of normal rats. *Scand. J. Immunol.* 4, 591.

Bretscher T. and Cohn, M. (1968). Minimal model for the mechanism of antibody induction and paralysis by antigen *Nature* 220, 444.

Cantor. H., Shen, F. W. and Boyse, E. A. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization, antigen specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T cell subclasses. *J. Exp. Med.* **143**, 1391.

Cooper, H. L. (1975). Coupling of nuclear and cytoplasmic events to membrane signals. In: "Immune Recognition", ed. A. S. Rosenthal, p. 411.

Cone, R. E. (1974). Cytophilic properties of T lymphocytes membrane associated immunoglobulins. In: "The Immune System", ed. E. E. Sercarz A. R. Williamson & C. F. Fox, Academic Press, p. 217.

Coutinho, A. (1975). The theory of the "one nonspecific signal" model for B cell activation. *Transplan. Rev.* **23**, 49.

Coutinho, A. and Möller, G, (1974). Immune activation of B cells: Evidence for one nonspecific triggering signal not delivered by the Ig receptors. Scand. *J. Immunol.* **3**, 133.

Coutinho, A., Gronowicz, E. and Möller, G. (1975). Signals and receptors in B cell activation. In: "Immune Recognation", ed. A. S. Rosenthal, p. 63.

Coutinho, A., Gronowicz, E. and Möller G. (1975), Mechanism of B cell activation and paralysis by thymus-independent antigens: Additive effects between NNP-LPS and LPS in the specific response to hapten. *Scand. J. Immunol.* **4**, 89.

Cross, A. M. and Mäkelä, O. (1968). Selective inhibition of the secondary response of primed cells by incubation with hapten. *Immunol.* **15**, 389.

Crumpton M. J., Auger, J., Green, N. M. and Maino, V. C. (1976). Surface membrane events following activation by lectins and calcium ionophore. In: "Mitogens in Immunobiology", p. 85.

Cunningham, B. A., Sela, B-A. Yahara, J. and Edelman G. M. (1976). Structure and activites of lymphocyte mitogens. In: "Mitogens in Immunobiology", p. 13.

Davie, J. M. and Paul, W. E. (1971). Receptors on immunocompetent cells. II. Specificity and nature of receptoss on dinitrophenylated guinea pig albumin-^{125}I-binding lymphocytes of normal guinea pigs. *J. Exp. Med.* **134**, 495.

Daniele, R. P. and Holian, S. K. (1976). A potassium ionophore (valinomycin) inhibits lymphocyte proliferation by its effects on the cell membrame. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S.) **73**, 3599.

Diener, E. and Feldman, M. (1972). Relationship between antigen and antibody-induced suppression of immunity. *Transplant. Rev.* **8**, 76.

Dutton, R. W. (1975). The non-specific T cell signal initiates differentiation. In: "Mitogens in Immunobiology", p. 237.

Edelman, G. M. (1974). Origin and mechanism of specificity in clonal selection In: "Cellular selection and regulationin the immune response" p. 1.

Eichmann, K. (1973). Idiotype expression and the inheritance of mouse antibody clones. *J. Exp. Med* **137**, 603.

Eichmann, K. and Rajewsky, K. (1975). Induction of T and B cell immunity by antiidiotypic antibody. *Europ. J. Immunol.* **5**, 661.

Feldmann, M. (1972). Cell interactions in the immune response in vitro. V. Specific collaboration via complexes of antigen and thymus-derived cell immunoglobulin. *J. Exp. Med.* **136**, 737.

Feldmann, M. and Basten, A. (1972). Cell interactions in the immune response in vitro. III. Specific co-operation across a cell impermeable membrane. *J. Exp. Med.* **136**, 49.

Feldmann, M. Cone, R. E. and Marchalonis, J. J. (1973). Cell interactions in the immuoresponse in vitro. VI. Mediation by T cell surface monomeric IgM. *Cell. Immunol.* **9**, 1.

Feldmann, M., Greaves, M. F., Parker, D. C. and Rittenberg M. B. (1974). Direct triggering of B lymphocytes by insolubolized antigen. *Europ. J. Immunol.* **4**, 591.

Fisher, D. B. and Mueller, G. C. (1968). An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytochaemagglutnin. *Proc. Nat. Aoad. Sci.* (U. S. A.) **60**, 1396.

Frenster, J. H. (1971). Ultrastructural probes of chromatin within living human lymphocytes. *Nature New Biol* **236**, 175.

Gally, G. A. and Edelman G. M. (1972). The ginetic control of immunoglobulin synthesis. *Ann. Bev. Genet.* **6**, 1—46.

Gell, P. G. H. and Sell, S. (1965). Studies of rabbit lymphocytes in vitro. II. Induction of blast transformation with antisera to six IgG allotypes and summation with mixtures of antisera to different allotypes. *J. Exp. Med.* **122**, 813.

Greaves, M. F., (1975). Cellular Recognition. Chapman & Hall, London.

Greaves. M. F. (1975). Scratching the surface. In:''Immune Recognition'', ed A. S. Rosenthal p. 1
Greaves M. (1975). Antigen receptors on T lymphocytes: A solution in sight? *Nature* **256**, 92.
Greaves, M. F. and Bauninger S. (1972). Activation of T and B cells by insoluble phytomitogens. *Nature New Bio.* **235**, 67.
Greengard, P. (1978). Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* **199**, 146.
Hadden, J. W., Hadden, E. M., Haddon, M. K. and Goldberg, N. D. (1972). Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **69**, 3024.
Jandinski, J., Cantor, H., Tadakuma, T., Peavy, D. L. and Pierce, C. W. (1976). Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. I. Polyclonal activation: Suppressor and helper activation are inherent properties of distinct T-cell subclasses. *J. Exp. Med.* **143**, 1382.
Janossy, G. and Greaves, M. F. (1975). Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets. *Transplant. Rev.* **24**, 177.
Kaplan, J. G and Quastel, M. R. (1975). Lymphocyte transformation and cation transport. In: ''Immune Recognition'', p. 391.
Katz, D. H. Hamaoka, T. and Benacernaf, B. (1974). Immunological tolerance in bone marrow-derived lymhocytes. III. Tolerance induction in primed B cells by hapten conjugates of unrelated immunogenic or ''nonimmunogenic'' carriers. *J. Exp. Med.* **139**, 1464.
Killander, D. and Rigler, R. (1969). Activation of deoxyribonucleoprotein in human leukocytes stimulated with PHA. I. Kinetics of the binding of acridine orange to deoxyribonucleoprotein. *Exp. Cell. Res.* **54**, 163.
Kleinsmith, L. J., Allfrey, V. G. and Mirsky, A. E. (1966). Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **55**, 1182.
Kolata, G. B. (1973). Cyclic GMP: Cellular regulatory agent? *Science* **182**, 149.
Langman, R. E., Armstrong, W. D. and Diener, E. (1974). Antigenic composition not the degree of polymerization determines the requirement for the thymus derived ceils in immune responses to Salmonella flagella. *J. Immunol.* **113**, 251.
Lisowska-Berstein, B., Rinuy, A. and Vasalli, P. (1973). Absence of IgM in enzymatically or biosynthetically labelled thymus derived lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70**, 2879.
Loeb, L. A., Ewald, J. L., and Agarnal, S. S. (1970). DNA polymerase and DNA replication during lymphocyte transformation. *Cacer Res.* **30** 2514.
Maino, V. C, Green, N. M., and Crumpton, M. J. (1974). The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. *Nature* **251**, 324.
Mandel, T. Byrt, P. and Ada, G. L. (1970). A morphological examination of antigen reactive cells from mouse spleen and peritoneal cavity. *Exp. Cell Res.* **58**, 179.
Maul, G. G., Maul, H. M., Scogna, J. E., Lieberman, M. W., Stein G. S., Hsu, B. Y-L., and Borum, H. W., (1972). The sequence of nuclear pore formation by phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **55**, 433.
Möller, G. (1975). One non-specific signal triggers B lymphocytes. *Transplant. Rev.* **23**, 126.
Marchalonis, J. J. (1969). An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* **113**, 299.
Marchalonis, J. J. (1974). Molecular and functional properties of lymphocte surface immunoglobulin. In: ''The Immune System''. p. 141.
Marchalonis, J. J. (1975). Lymphocyte surface immunoglobulins. Science **190**, 20.
Morchalonis, J. J. and Cone. R. E. (1973). Biochemical and biological characteristics of lymphocyte surface immunoglobulins. *Transplant. Rev.* **14**, 3.
Marchalonis, J. J., Cone, R. E. and Santer, V. (1971). Enzymic iodination. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes *Biochem. J.* **124**, 921.
Marchalonis, J. J., Cone, R. E. and Atwell, J L. (1972). Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins. *J. Exp. Med.* **135**, 956.
Marchalonis, J. J., Cone, R. E., Atwell. J. L. and Rolley, R. T. (1972). Structure and function of lymphocyte surface immunoglobulin. In: ''The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms'', eds. Lee, J. W. & Pollak, J. K., Austrlia & New Zealand Book Co., Syaney.
Marchalonis, J. J., Bucana, C., Hoyer L., Warr, G. W. and Hanna, M. G. (1978). Visualization of a guinea pig T lymphocyte surface component cross-reactive with immunoglobulin. *Science* **199**, 433.
Melcher, U., Vitteta, E. S., McWilliams, M., Lamm, M. E., Phillips-Quagliata, J. M. and Uhr, J. W.

(1974). Cell surface immunoglobulin. X. Identification of an IgD-like molecule on the surface of murine splenocytes. *J. Exp. Med.* **140**, 1427.

Mitchison, N. A. (1967). Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the secondary response. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **32**, 431.

Munro. A. J. and Taussig, M. J. (1975a). Two genes in the major histocompatibility complex control immune response. Nature **256**, 103.

Munro A. J. and Taussig, M. J. (1975b). Role of products of the I-region of the H-2 complex in cell cooperation. In: "Mitogens in Immunobiology", p. 261.

Nathanson, J. A. and Greengard, P. (1978). "Second messengers" in the brain. *Sci. Amer.* **237**(2). 108.

Negendank, W. G. and Collier, C. R. (1976). Ion contents of human lymphocytes. The effects of concanavalin A and quabain. *Exp. Cell. Res.* **101**, 31.

Parkhouse, R. M. E., Janossy, G. and Greaves, M. F. (1972). Selective stimulation of IgM synthesis in mouse B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Nature New Biol.* **235**, 21.

Paul. W. E. (1973). Antigen recognition and cell-receptor sites. In: "Defence and Recognition". MTP Int. Rev. Sci. V. 10. p. 329, ea. R. Porter.

Paul. W. E. and Benacerraf. B. (1977) Functional specificity of thymus dependent lymphocytes. *Science* **195**, 1293.

Pegoraro, L. and Bernengo, M. G. (1971). Thymidine kinase, deoxycytidine kinase and deoxycytidylate deaminase activities in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* **68** 283.

Pernis, B., Forni, L. and Amante, L. (1970a). Ig spots on the surface of rabbit lymphocytes. *Nature* **277**. 1051.

Pernis, B., Forni, L. and Amante, L. (1970b). Immunoglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes. *J. Exp. Med.* **132**. 1001.

Pogo B. G. T. (1972). Early events in lymphocyte transformation. I. DNA-dependent RNA polermerase activities in isolated lymphocyte nuclei. *J. Cell Biol.*, **53**, 635.

Pogo, B. G. T., Allfrey, V. G., and Mirsky, A. E. (1966). RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **55**, 805.

Pogo, B. G. T. and Katz, J. R. (1974). Early events in lymphocyte transformation by phytohemagglutinin. 2. Synthesis and phosphorylation of nuclear proteins. *Differentiation* **2**, 119.

Quastel, M. R. (1975). Lymphocyte activation: The coupling of membrane signal to nuclear and cytoplasmic events. In: "Immune Recognition". p. 517.

Rabellino, E., Colon, S., Grey, H. M. and Unanue. E. R. (1971). Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *J. Exp. Med.* **133**, 156.

Raff, M. C. (1970). Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice, distinguishable by immunoflorescenc, *Immunol.* **19**. 637.

Resch, K. and Ferber. E. (1975). The role of phospholipids in lymphocyte activation. In: "Immune Recognition", p. 281.

Resch, K., Gelfand, E. W., Hanson, K. and Ferber, E. (1972). Lymphocyte activation: Rapid chages in the phospholipid metabolism of plasma membranes during stimulation. *Europ. J. Immunol.* **2** 598.

Rolley, R. T. and Marchalonis, J. J. (1972). Release and assay of antigen binding immunoglobulin from the surfaces of lymphocytes of unsensitized mice. *Transplantation* **14**, 734.

Rosenthal, A. S. and Shevach, E. M. (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* **138**, 1194.

Rudland, P. S., Seeley, M. and Seifert, W. (1974). Cyclic GMP and cyclic AMP levels in normal and transformed fibroblasts. *Nature* **251**, 417.

Schimpl A. L. and Wecker, E. (1972). Replacement of a T cell function by a T cell product. *Nature New Biol.* **237**, 15.

Schimpl, A. and Wecker. E. (1975). A third signal in B cell activation given by TRF. *Transplant. Rev.* **23**, 177.

Segal, S., Globerson, A., Feldmann, M., Haimovich, J. and Givol, D. (1969). Specific blocking in vitro of antibody synthesis by affinity labelling reagents. *Nature* **223**, 1374.

Schultz, G., Hardman, J. G., Schultz, K., Baird, C. E, and Sutherland, E W (1973). The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3′,5′-cyclic monophosphate levels. *Proc Nat.*

Acad. Sci. (U. S. A.) **70**. 3889.

Sutherland. E. W. and Robinson, C. A. (1966). The role of cyclic-3′.5′-AMP in response to catecholamines and other hormones. *Pharm. Rev.* **18**, 145.

Taylor, R B., Duffus, P. H., Raff M C., and de Peteris, S. (1971). Redistribution and pinocytosis, of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.* **233** 225.

Taussig, M. J. (1974). T cell factor which can replace T cells in vivo. *Nature* **248**. 234.

Unanue, E. R. (1972). The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation. *Adv. Immunol.* **15**. 45.

Vitetta, E. S. and Uhr, J. W. (1975). Immunoglobulin-receptors revisited. *Science* **189**. 964.

Vitetta, E. S., Baur, S. and Uhr, J. W. (1971). Cell surface immunoglobulin. IV Distribution among thymocytes, bone marrow cells, and their derived populations. *J. Exp. Med.* **136**, 81.

Wang. J. L., Gunther. G. R., McClain D. A., and Edelman. G. M. (1976). Biochemical signals modulating lymphocyte mitogenesis. In: ''Mitogens in Immunobiology'', p. 103.

Walters, C. S. and Wigzell, H. (1970). Demonstration of heavy and light chain antigenic determinants on the cell-bound receptor of antigen. Similarities between membrane-attached and humoral antibodies produced by the same cell. *J. Exp. Med.* **132** . 1233.

Warner, N. L., Byrt, P. and Ada, G. L. (1970). Blocking of the lymphocyte antigen receptor site with anti-immunoglobulin sera in vitro. *Nature* **226**, 942.

Watson, J. (1974). The nature of the signals required for the induction of antibody synthesis. In: ''The Immune System'', p. 511.

Watson, J. (1975). Cyclic nucleotides as intracellular mediators of B cell activation. *Transplant. Rev* **23**, 233.

Watson, J., Epstein, R. and Cohn, M. (1973). Cyclic nucleotides as intracellular mediators of the expression of antigen-sensitive cells. *Nature* **246**. 405.

Weinstein. Y., Chambers, D. A., Bourne, H. R. and Melmon, K. L (1974). Cyclic GMP stimulates lymphocyte nucleic acid synthesis. *Nature* **251**, 352.

Whitney, R. B. and Sutherland, R. M. (1973). Requirement for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. *J. C ll Physiol* **80**, 329.

Wofsy, L. Kimura, J. and Paolo, T-B. (1971). Cell separation on affinity columns: The preparation of pure populations of anti-hapten specific lymphocytes. *J. Immunol.* **107**. 725.

第十四章　免疫球蛋白的合成

B 淋巴球被抗原激活后，开始增生和分化成为一群产生和分泌免疫球蛋白的细胞。同时，这些细胞的蛋白质合成、转运和分泌也发生显著的改变。原先对抗原敏感的小淋巴球、免疫球蛋白的合成很弱，主要作为受体分子加入到细胞膜内；而分化的浆细胞、免疫球蛋白大量合成，并主要运送和分泌到细胞外，作为体液抗体起作用。这说明 B 细胞在分化过程中，基因表现发生了明显的改变。

免疫球蛋白具有四条肽链的基本构造，并可能聚合成多聚体。每一条肽链（重链和轻链）在结构上又分为 V 区和 C 区，分别受两个结构基因（V 和 C）控制。其次，细胞内轻链和重链的合成是分别在不同的多聚核糖体上进行的。正常的抗体形成细胞中，两种肽链的合成速度是协调一致的，表明存在着某种调节机制。因此，除去蛋白质合成的一般规律外，免疫球蛋白肽链的合成及其调节、分子装配、运输和分泌等方面都应有特点。对于这些特点的深入研究，将会加深我们对高等真核生物的细胞分化中基因表现和蛋白质合成的认识。为了讨论方便起见，先简略地叙述一下免疫球蛋白合成的细胞生物学研究方面的结果。

一、细胞内抗体合成的地点

（一）合成抗体的细胞

从六十年代起许多方面的研究结果都证明，产生抗体的细胞是 B 淋巴球以及由它们衍生出来的浆细胞。利用萤光标记抗体法，发现淋巴球，尤其是浆细胞内都有免疫球蛋白存在。但是，要证明哪些细胞真正合成抗体，单凭发现细胞内有免疫球蛋白存在是不够的，还应证明这些细胞确实在继续不断地产生抗体。

N. K. Jerne（1963）创建的溶血空斑技术（Placque technique）提供了识别和计数抗体形成细胞的简便方法。小鼠用羊红血球免疫后不同天数，将其脾脏细胞和羊红血球混合，悬浮于琼脂板内，在 37°C 保温一小时。然后，再加补体，就可以观察到在单个的分泌抗体细胞周围的羊红血球被溶血，出现空斑（图 14-1）。在免疫后第 1 天，每一支小鼠的脾脏只含有 25 个空斑形成细胞。4 天后，便迅速地增加到约 60,000 个，达到了高峰，然后迅速地降低。此外，若用适当方法把半抗原或抗原连接到羊红血球表面时，空斑技术还可以扩大应用于检测这些半抗原或抗原的抗体形成细胞（Jerne，1963）。

（二）抗体在细胞内合成的地点

小淋巴球受到抗原刺激后的亚显微形态变化可作为细胞分化的指标。从细胞质很少

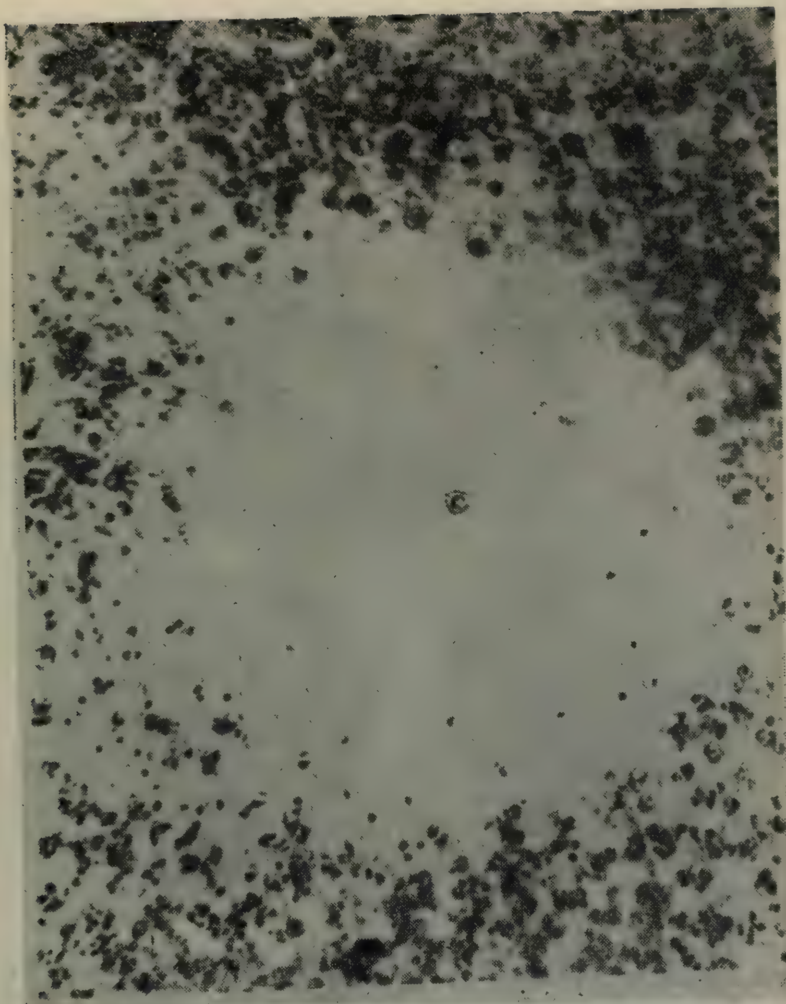


图 14-1 琼脂板上溶血空斑中央的一个淋巴样细胞（Jerne 等，1963)。

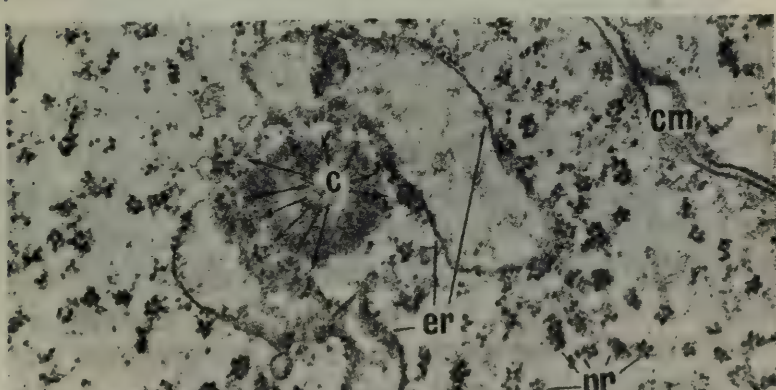


图 14-2 小鼠脾脏细胞受 LPS 刺激 28 小时后，在内质网的横切面上， 多聚核糖体在内质网的膜层（er）表面排列成半月形（c)。(Pr) 细胞质内的游离多聚核糖体。(Cm)细胞膜(据 Janossy 和 Greaves, 1975)。

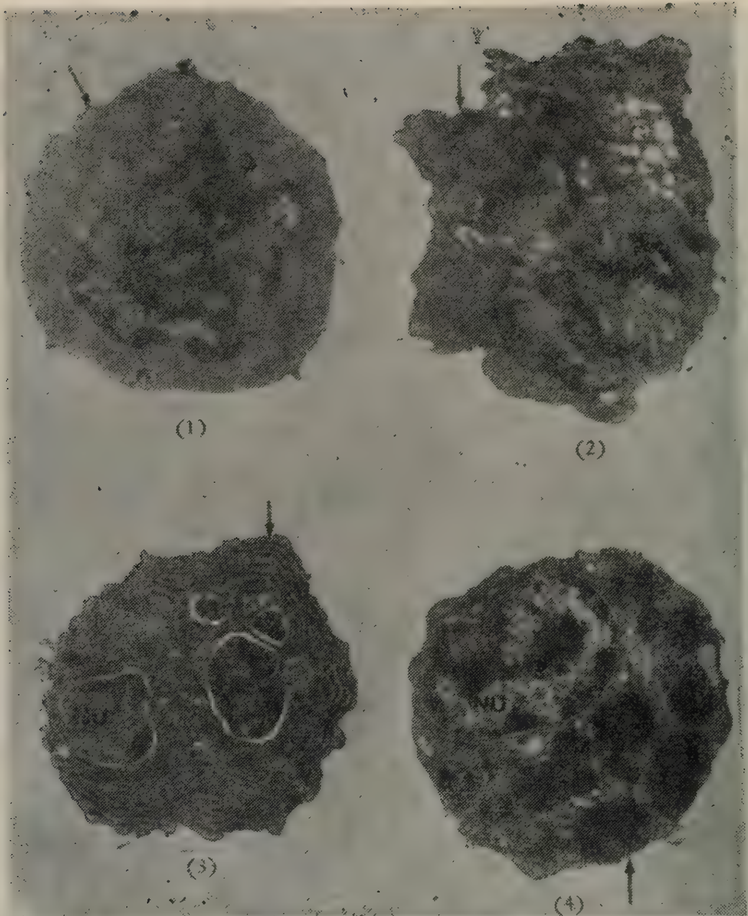


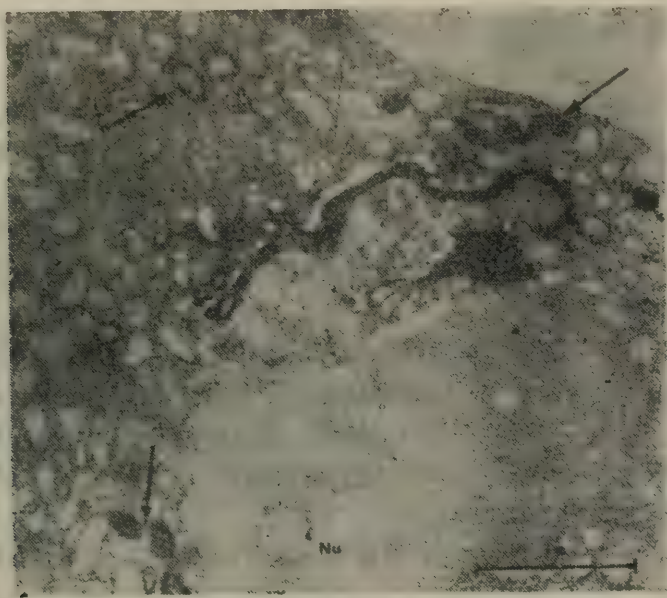
图 14-3 分泌抗过氧化物酶抗体的免疫细胞。溶血空斑实验的细胞取自经辣根过氧化物酶免疫的家兔，所有的细胞取自空斑的中央。(1) 核糖体染色浅的淋巴球(→)×7,350。 (2) 前浆细胞，粗糙内质网嵴池内(→)充满抗体；周沿高尔基囊泡(▶)内也有一些抗体 ×6,400。(3) 浆细胞，抗体普遍分布在片层状排列的内质网(→)内，×6,400。 (4) 形成空斑的 Mott 细胞之 Russel 氏体内的抗过氧化物酶抗体 (Avrameas, 据 Kabat, 1976)。

的小淋巴球，分化为淋巴母细胞和浆细胞的过程中，细胞质愈来愈增加。和其他大量分泌蛋白质的细胞一样，浆细胞有很发达的粗糙内质网和平滑内质网以及高尔基体。

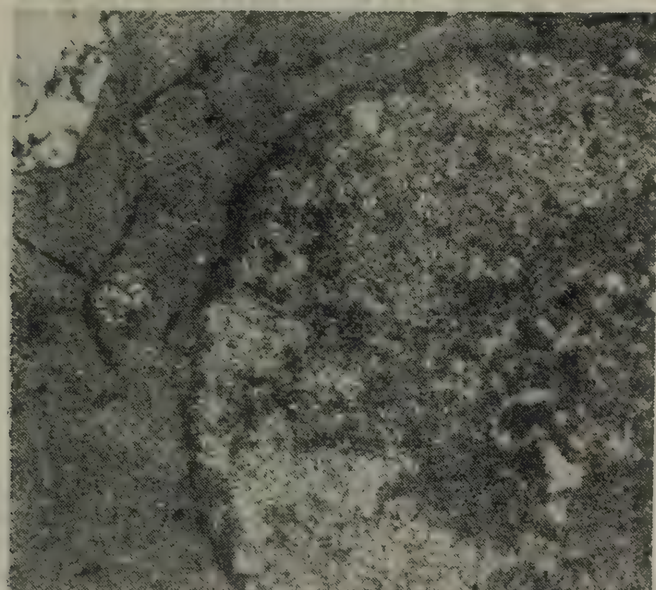
一个位于空斑中心的抗体形成细胞正处在不断分化的过程中。当用电子显微镜观察，受 LPS 刺激后 16—24 小时，取自空斑中心的小鼠脾脏细胞，可以清楚地看到从小淋巴球发育成淋巴母细胞的初期过程。细胞质内先出现游离的多聚核糖体和膨大的线粒体。最先出现抗体合成的地点是在核周隙和少数发育较差的嵴池内。从 24—30 小时起，内质网系的发育加强了，愈来愈多的多聚核糖体附着到它的膜上。在横切面上，可以看到多聚核糖体在内质网膜层表面排列成半月形(图 14-2)。免疫球蛋白肽链的 mRNA 很可能参与这些多聚核糖体的形成 (Janossy 和 Greaves, 1975)。

对于抗原(如辣根过氧化物酶)激活的 B 淋巴球，也可以观察到粗糙内质网同样的发育过程。随着粗糙内质网的逐步发育，抗体最先在部分嵴池和高尔基体中出现，并逐渐增多。最后，遍布于十分发达的片层状排列的内质网中，呈现十分活跃的分泌状态 (图

14-3)。比较初级免疫和次级免疫后，淋巴细胞内抗体的分布，发现次级免疫后粗糙内质网的嵴池和核周隙内抗体的含量比初级反应的细胞内显著地要多(图 14-4)。



(1)



(2)

图 14-4　初级和次级免疫后大鼠免疫细胞内抗体的分布。(1) 辣根过氧化物酶加 Freund 佐剂足掌一次注射后 5 天之腘淋巴结细胞。成熟浆细胞的粗内质网的少数嵴池(→)内和高尔基体 (G) 内可见抗过氧化物酶抗体。 (2) 隔初级免疫 8 个月，再用辣根过氧化物酶加盐水次级免疫后 3 天之腘淋巴结细胞。抗体位于发育中的粗内质网的片层(→)内和核周隙(▶)内(据 Avrameas 等，录自 Kabat, 1976)。

（三）抗体合成细胞的潜能

一个免疫活性细胞究竟能合成多少种抗体或免疫球蛋白，是免疫学中还有不少争论的问题。

目前一般认为，在多数情形下大多数分泌抗体的B细胞在一定时间，只合成一种抗体或免疫球蛋白。利用萤光双标记抗体（抗κ、λ链，抗μ、α、γ重链的抗血清）进行实验，发现绝大多数淋巴细胞只含有一种轻链（κ或λ链）或重链，只有1%或2%的细胞同时兼有两种链。进一步研究还发现B细胞在发育过程中，可以从合成IgM转变为合成IgG（Wabl 等，1978），并且在一定时期可以同时发现这两类Ig。此外，也发现某些骨髓瘤细胞能同时分泌两类免疫球蛋白。

利用空斑技术，有人证明大多数淋巴细胞在接受两个不同的抗原或同一抗原的两个不同的抗原决定簇的刺激时，在一定时间只能产生一种抗体，只有极其少数的细胞能同时产生两种抗体。然而，最近的一些研究指出，在B细胞成熟的早期，接受不同抗原刺激后同一个细胞可能合成两种抗体。 上述这些事实对于了解B细胞的基因表现问题是相当重要的，后面我们还会讨论到。

对抗体合成的细胞生物学方面，有兴趣的读者可以参考 L. Weiss（1972）的专著。

二、免疫球蛋白肽链（重链和轻链）的合成

关于蛋白质合成的一般概念主要是在原核细胞上得到的。控制蛋白质合成的遗传信

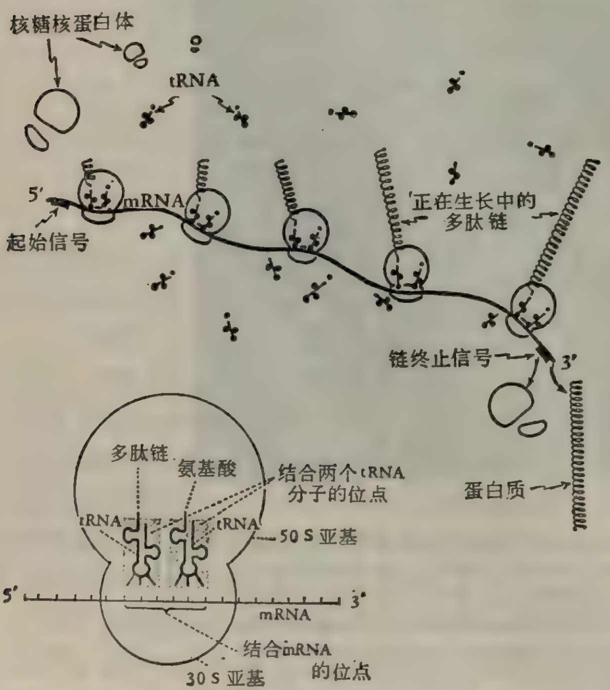


图14-5 多聚核糖核蛋白体上蛋白质的合成，示五个核糖核蛋白体在通过一条mRNA链的过程中，形成一条蛋白质链。右下角的核糖核蛋白体刚从mRNA上脱开，完成了相应蛋白质的合成。 左上角的核糖核蛋白体正要和mRNA接触。 左下图：一个核糖核蛋白体的放大，示和30S亚基结合的mRNA，及两个tRNA分子。 左边那一个tRNA位于肽酰tRNA结合位点上，带有正在增长中的多肽链。 右边那一个占有氨基酰-tRNA结合位点（据 Davidson. 1969）。

息是以 DNA 碱基顺序的形式储存在染色质上的。通过基因转录产生的 mRNA，转移到核糖核蛋白体上，把许多核糖核蛋白体连接成多聚核糖核蛋白体，构成蛋白合成的功能单位。各种氨基酸被相应的 tRNA 携带到多聚核糖体上，按照 mRNA 荷载的密码顺序，依次一个一个地连接在一起，形成多肽链。mRNA 密码阅读的方向是从 5′ 端到 3′ 端方向进行的，蛋白质肽链的转译也相应地从 N 端到 C 端，逐步地延长(图 14-5)。

在原核细胞（如细菌），基因转录成 mRNA 和 mRNA 转译成蛋白质的两个过程是直接偶联的。mRNA 一面从 DNA 上转录下来，一面就开始蛋白质的合成，并且在整个蛋白质分子的合成完成以前，mRNA 就可能开始降解了。因此，原核细胞的 mRNA 的生存时间是非常短暂的，并且 mRNA 就是结构基因的直接复本。由于这种偶联的存在，蛋白合成的调节也主要是在转录水平，通过调节基因产生的阻遏蛋白（Repressor protein）和 DNA 的特定部位(操纵基因)的结合或解离来实现的。

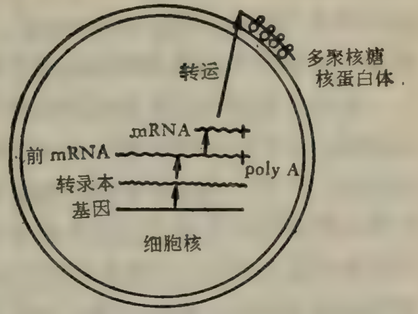


图 14-6　真核细胞内从基因到蛋白质的信息流向，示从基因的转录至 mRNA 转移到细胞质中的“加工”步骤(Stevens 和 Williamson, 1974)。

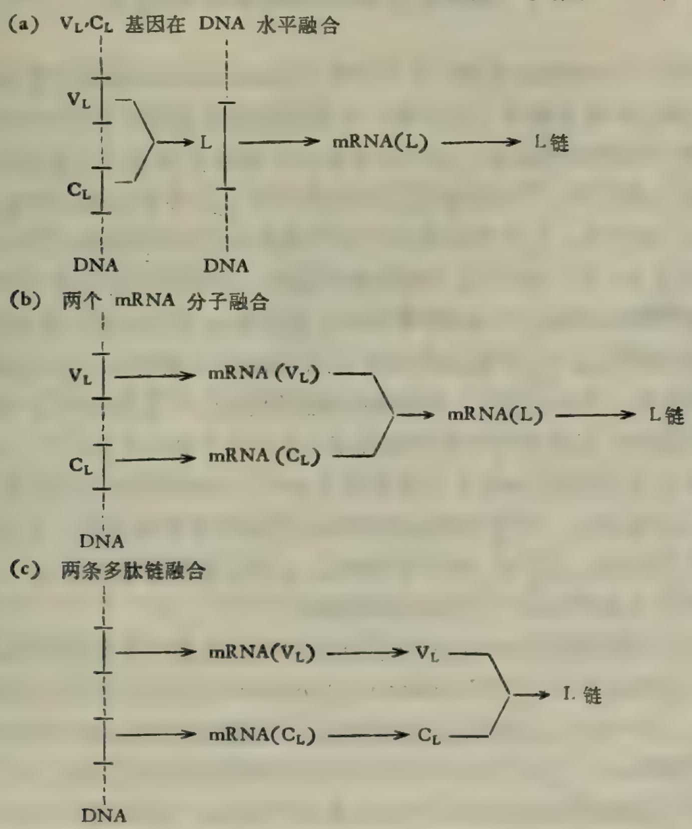


图 14-7　两个基因编码一条多肽链的遗传控制途径。V，C 基因分别编码的信息的融合可能发生在不同的水平。途径 (a)：V_L 和 C_L 在 DNA 水平融合为一个完整的 L 基因，进行转录，产生的 mRNA(L) 再转译出 L 链。途径 (b)：V_L 和 C_L 独立地转录，分别产生的 mRNA 再融合为一，融合的 mRNA(L) 再转译成 L 链。途径 (c)：V_L 和 C_L 分别地转录和转译，得到的 V_L，C_L 肽链再连接成一条 L 链。

与此不同，真核细胞由于染色体组成和结构的复杂化(组蛋白、酸性蛋白等) 和核的形成，基因的转录和蛋白合成是在细胞内被核膜分隔的不同区域内进行的。在核内，刚从 DNA 转录下来的 RNA (转录本) 先是以较大的 mRNA 前体(前-mRNA)形式存在。然后在从核内到核外的转移过程中，要经过一段复杂的“加工”，才能成为有功能的 mRNA (图 14-6)。 真核细胞 mRNA 存在的时间长，有功能的 mRNA 在细胞质内的寿命可长达几小时到几天。由于遗传物质的结构和信息传递的复杂性，真核细胞蛋白合成的调节可能在不同的水平(转录、mRNA 的“加工”、转译和转译后肽链的改变等) 上进行。这些都是真核细胞的基因表现不同于原核细胞的地方。

除去上述真核细胞蛋白合成的一般特点以外，抗体的生物合成还有其独特之处。免疫球蛋白具有四条多肽链的基本结构。每一条多肽链(重链或轻链)的结构又是由两个结构基因 (V, C) 共同决定的。这要求把这两个基因的信息整合为一。如图 14-7 所示，这种整合作用发生在遗传信息传递途径的什么水平 (DNA, mRNA 或多肽水平)，免疫球蛋白多肽链 mRNA 的结构又有什么特点? 这些特殊的问题曾经是免疫球蛋白生物合成研究的主要对象。目前，通过下述几方面的研究已基本上得到解决。

(一) 合成重链和轻链的多聚核糖体

六十年代初期，对网织红血球、肝细胞和 HeLa 细胞的研究发现蛋白合成是在由 mRNA 连系起来的多聚核糖体上进行的。多聚核糖体是蛋白合成的功能单位。

根据蛋白质合成的现代概念，抗体的重链和轻链的合成也应当是在浆细胞粗糙内质网的多聚核糖体上进行的。 从血红朊合成的资料得知，多聚核糖体的长度大致相当于 mRNA 的长度。据计量，在多聚核糖体上两个核糖体之间的距离约为 90 个核苷酸，这一长度大约相当于 300 Å。 假若这一情况有普遍性，就可以估计出参与抗体多肽链合成的多聚核糖体的长度。按照三字密码，和 450 个氨基酸残基组成的 γ 链相对应的mRNA，应有 1,350 个核苷酸残基 (分子量约为 450 万)。因此，γ 链在其上合成的多聚核糖体的长度应等于 4,500 Å，或相当于 15 个核糖体相连的长度。 轻链大约有 200 个氨基酸残基，相对应的 mRNA 应由 600 个核苷酸残基组成 (分子量约为 18 万)。相应地，合成轻链的多聚核糖体的长度应为 1800 Å，或相当于 6—7 个核糖体相连的长度。 理论上，在抗体形成细胞的细胞质中，应当找到这两种大小不同的多聚核糖体。然而，脾脏和淋巴结内含有大量 RNA 酶，易于使 mRNA 降解，从而使多聚核糖体解体。 因此，从这些组织分离和测量多聚核糖体的工作往往遇到困难。

骨髓瘤细胞非常旺盛地合成免疫球蛋白或轻链，细胞质内含有大量的多聚核糖体，因而是研究这一问题的好材料。Williamson 和 Asconas (1967a)为了避免多聚核糖体被 RNA 酶破坏，在用 0.5% 脱氧胆酸处理瘤细胞，使细胞破碎后，就立即把这一混合物加到蔗糖密度梯度表面，马上进行离心分离。在这种实验条件下，发现大小不同的两种多聚核糖体，并用抗重链或抗轻链的专一抗血清进行检测，证明在较大的多聚核糖体(300 S) 上有重链存在；而在较小的多聚核糖体 (120—180S) 上有轻链存在。 按分子大小估计，前者可能含有 12—16 核糖体，后者含有 5—6 核糖体。后来，对同一材料进行电子显微镜观察，也发现两类多聚核糖体，其大小和上述大致相当。此外，对另一种浆细胞

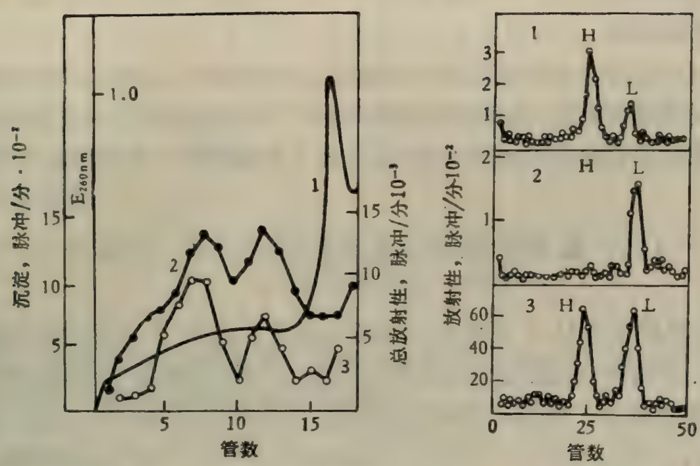


图 14-8 小鼠浆细胞瘤 MOPC-21 之多聚核糖体的蔗糖梯度分离。细胞经 ^{3}H-亮氨酸标记 10 分钟后，分离多聚核糖体，并用抗 MOPC-21 IgG 抗血清沉淀。左图：(1) E260mμ；(2) TCA 沉淀的放射强度；(3) 血清学沉淀的放射强度。 右图：多聚核糖体血清学沉淀的聚丙烯酰胺凝胶电泳。(1) 重的多聚核糖体部分；(2) 轻的多聚核糖体部分；(3) 上清液。H，L 是重链和轻链的迁移位置(据 Schubert, 1968)。

瘤 5563 的电子显微镜观察，也发现合成 L 链的多聚核糖体含有 4—5 个核糖体，而合成 H 链的，则含有 11—18 个核糖体 (DePeteris, 1970)。这些数字和计算预测的结果颇为一致。

Schubert (1968) 用小鼠骨髓瘤细胞株 (MOPC-21) 进行实验。如图 14-8 所示， 细胞裂解产物经蔗糖密度梯度离心时，在多聚核糖体区域呈现出能被抗 Ig 抗血清沉淀的两个清楚的峰。 取自重的(沉降较快的) 多聚核糖体部分，在凝胶电泳上主要呈现出重链，有少量轻链；而轻的多聚核糖体部分只呈现出轻链(图 14-8)。

用免疫动物的淋巴结细胞进行实验，也得到类似的结果。Kuechler 和 Rich(1969) 将 ^{3}H-尿嘧啶注射到次级免疫后不同天数的家兔淋巴结内。25 分钟后，分离淋巴结，制备细胞提取物，立即作蔗糖密度梯度离心，结果发现有两种随着多聚核糖体消长迅速标记的 RNA。从图 14-9 可见，次级免疫的当天，大多数核糖体为 74S，只有大约 20% 作为多聚核糖体沉淀。次级免疫后 2 天时，多聚核糖体迅速增多 (达到 50—60%)，较轻的多聚核糖体峰 (L) 明显地出现。 和多聚核糖体一起沉降的被 ^{3}H-尿嘧啶迅速标记的 RNA 放射性强度也增高。第 3 天后，多聚核糖体呈现明显的双峰 (L 和 H)，此后高度逐渐降低。这两种迅速标

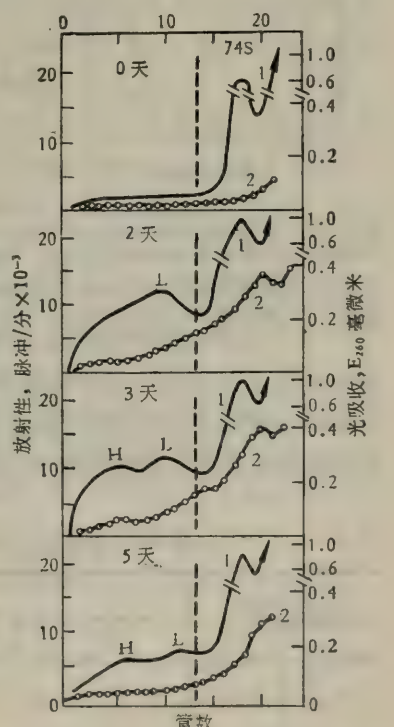


图 14-9 家兔次级免疫后不同天数淋巴结细胞内多聚核糖体之蔗糖密度梯度分离(据 Kuechler 和 Rich, 1969)。

记的 RNA 从沉降常数估计，分子量各为 3.7×10^5 和 2.2×10^5，很接近编码 H 链和 L 链的 mRNA 的分子量。

总之，目前可以肯定抗体的重链和轻链是分别在两种大小不同的多聚核糖体上合成的，其大小和计算值相近。由此可以推论 H 链和 L 链可能是以一条完整的多肽链的形式合成的。每条链各有自己专一的 mRNA。这一推论得到下述实验的支持。

（二）整条重链或轻链的合成——单一的起点

如前所述，多肽链是从 N 末端向 C 末端依次地合成的。当用放射性氨基酸作短暂的脉冲标记后，分析新合成的多肽链的酶解片段，就会发现近 C 末端的片段放射性强，向 N 末端方向逐步减弱，呈现一个明显的梯度（Dintzis，1961）。由此，也可以用同样的方法来判断，免疫球蛋白的重链和轻链是从单一的起始端向一个方向延长，依次合成的(图 14-10，模型 I)；或者重链和轻链各自是由两段独立地合成的多肽，连接起来的（图 14-10，模型 II）。

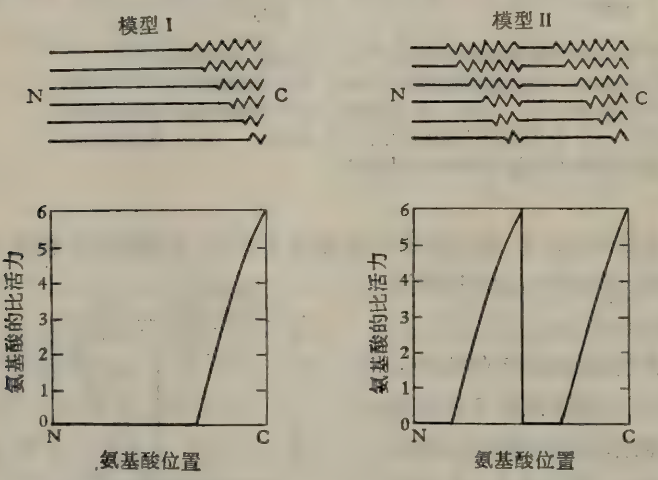


图 14-10　经过短暂脉冲标记后，新合成 L 链上放射性氨基酸的分布。模型 I 示 L 链从一个模板 mRNA 上转译。模型 II 示 L 链是由分别从两个模板上转译的肽段连接起来的。上图：短暂脉冲标记后放射性标记（∿∿∿）和非标记(——)氨基酸在 L 链上的分布。下图：氨基酸的比活力与其在多肽链上的位置之间的函数关系(据 Dintzis, 1961)。

Fleichman (1967) 研究了 ^{3}H-亮氨酸参入家兔淋巴细胞合成 γ 链的过程，发现经过短暂温育时 (30 秒、1 分)，放射性的比活力从 N 末端片段到 C 末端片段逐渐增加（表14-1）。这清楚地表明，IgG 的 γ 链的合成是按照模型 I 的方式，从 N 末端开始，向 C 末端依次进行，合成整条重链。Lennox 等 (1967) 对轻链合成过程中，标记氨基酸参入的实验，也得到基本上相同的结果。脉冲标记的轻链的酶解片段的比活力也可以排列成符合单起始点模型的系列。

表 14-1　家兔重链 (γ) 经 ^{3}H-亮氨酸标记的溴化氰裂解片段之比活力*

和 ^{3}H-亮氨酸温育时间	片段				
	C1	C2	C3	C4	C5
30 秒	1.0	1.3	3.9	5.8	5.5
1 分	1.0	0.7	1.8	2.0	2.7
4 小时	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8

* 比活力是用每一片段的 ^{3}H 脉冲数与均匀标记的重链(温育 4 小时)的同一片段的 ^{3}H 脉冲数的比值表示。C1 的比值定为 1.0 (据 Fleichman, 1967)。

总之，以上两方面的证据都支持H链和L链是作为一条完整的多肽链，从一个起始点开始依次地合成的。因此，L和H链合成在转译水平原则上和其他蛋白质的合成没有什么区别。由此还可以推论，H链和L链各自有自己专一的mRNA，并且它们都含有合成V区和C区的全部信息。至于V区和C区信息的整合是发生在DNA水平还是转录水平（mRNA的融合），还需要对H链和L链的mRNA以及V、C基因的结构进行深入的研究才能确定。

（三）重链和轻链的 mRNA

目前已经从小鼠骨髓瘤细胞分离出重链和轻链的 mRNA，并且在无细胞系统或爪蟾卵母细胞中合成了相应的多肽链或免疫球蛋白。

1.轻链 mRNA

Stavnezer 和 Huang（1971）从一种主要合成和分泌κ轻链的小鼠浆细胞瘤（MOPC 41 A）的微粒体部分，经蔗糖密度梯度离心得到的一个RNA部分（9—13 S），能在兔网织红血球无细胞蛋白合成系统中转译出完整的轻链。继之，Brownlee 等（1972）用另一种小鼠浆细胞瘤（MOPC 21）证实了这一实验，同样发现轻链的mRNA存在于10—12 S RNA部分内。当在同一无细胞蛋白合成系统中转译时，能产生一条比正常的L链在N末端多14或15个氨基酸残基的多肽链，并认为可能是L链的前体，其额外肽段可能和内质网的膜层结合，可能和分子的转运、分泌有关系。以上方法得到的轻链mRNA还是不均一的，转译产物也有其他多肽成分混杂。

已知哺乳类细胞的大多数mRNA在3′端具有相当长的 Poly A 顺序，它和这些mRNA在细胞内的稳定性有关系（Huez 等，1978）。利用这一特点，就可以用 PolyU-纤维素或 PolydT-纤维素亲合层析法来纯化这一类 mRNA。Schechter（1973）用抗L链抗体专一地沉淀 MOPC-321 浆细胞瘤的多聚核糖体，从其中分离出mRNA，再经过寡聚(dT)-纤维素亲合层析纯化。这样得到的L链mRNA的纯度经生物活性鉴定达到≥95%。在无细胞测活系统中，证实纯化的L链mRNA能控制合成两种比L链要重1300和4700道尔顿*的多肽链。同时，还证明L链mRNA主要包括两种大小不同的分子，分子量各为420,000和450,000道尔顿。它们比编码L链所需的多核苷酸链的长度（约250,000道尔顿）要长很多，可能是L链mRNA的前体。过剩的部分可能包括Poly A以及和合成上述多肽链的额外部分有关系。此外，Mach 等（1973）也从微粒体得到含 Poly A 的 mRNA，经鉴定包含一个主要成分（约为1100核苷酸单位）和几个小成分。在无细胞系统中转译的主要产物是比L链长20残基的多肽链以及另外两条肽链。

总之，从几种分泌L链的浆细胞瘤分离出含 Poly A 的 mRNA（9—14S）在离体合成系统中，都能转译出完整的L链或L链的前体。这种L链mRNA要比编码L链所需的多核苷酸链的长度要长18—60核苷酸单位，甚至更多。这一多余的部分可能转译成L链前体的额外肽段，然后再被酶切去。

---

* 分子量的单位，相当于 ^{12}C 的 $\frac{1}{12}$。

2.重链 mRNA

Stevens 和 Williamson (1973a) 发现在 Na^+和 Mg^{++}离子浓度分别为 75 m*M* 和 0.5 m*M*，低温条件下，5563 髓细胞瘤蛋白 (H_2L_2) 能选择地和相应的重链 mRNA 结合，并且这种结合可能对 H 链合成在转译水平的调控起反馈调节作用(见 455 页)。H_2L_2 分子和 H 链的这种弱相互作用可能被外加的抗 H_2L_2 抗体稳定下来，结果 H 链mRNA 便和 H_2L_2-抗 H_2L_2 免疫复合物共同沉淀。这种作用是专一的。因此，可以利用抗5563髓细胞瘤蛋白的抗体处理来专一地沉淀此 RNA-蛋白质复合物，由此可以得到高度纯化的H 链 mRNA。 这样分离的 mRNA 经 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析可区分出分子量不同的三条带(图 14-11)，并且对胰 RNase 酶解的抵抗力也有不同。 带 III RNA 能和 Poly U 滤纸结合，并对胰 RNase 酶解的抵抗力较强 (8%)，证明可能具有较长的PolyA 链。 带 II 不能和 Poly U 滤纸结合，对胰 RNase 抵抗力小(<2%)。因此可能含有较短的 Poly A 链 (Stevens 和 Williamson, 1973 a)。

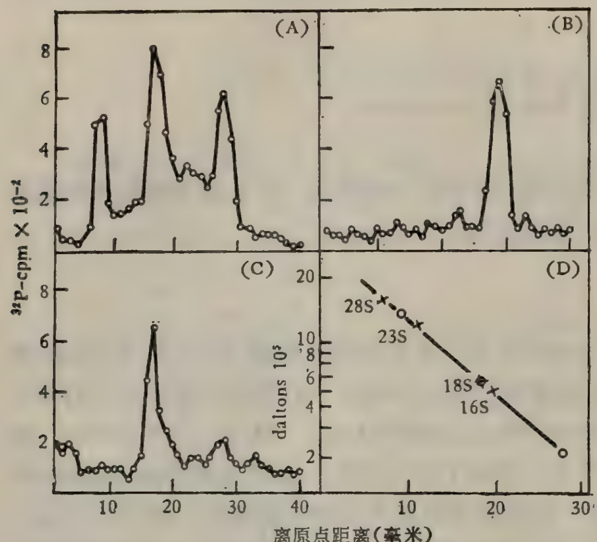


图 14-11 抗体沉淀 RNA 之丙烯酰胺凝胶电泳分析。 5563 骨髓瘤细胞(10^7/毫升)经 ^{32}P-正磷酸(100 微居里/毫升)标记 6 小时后，分离总 RNA 和细胞质 RNA。 细胞总 RNA(A)，细胞质 RNA，富含 mRNA(B) 和细胞质 RNA，富含 rRNA(C)，分别在0°C用 5563 髓细胞瘤蛋白和抗 5563 抗血清处理 5 分钟，收集沉淀，洗涤二次。 沉淀内加 ^{3}H 标记骨髓瘤细胞的 28S 和 18S rRNA和大肠杆菌的 23S 和 16S rRNA 作为参考。 混合物在 2% 聚丙烯酰胺柱上分析，并切成 1 毫米片段测放射性。从图D上 rRNA 分子量和迁移率标准曲线上，根据 RNA 带 (I, II, III) 的迁移率 (◦) 可求出相应的分子量(据 Stevens 和 Williamson, 1973a)。

爪蟾卵母细胞是比无细胞蛋白质合成系统更好的 mRNA 转译测试系统 (Gurdon 等，1971；Gurdon，1974)。把从聚丙烯酰胺柱上带 II 或带 III 洗脱下来的 RNA 注射到爪蟾卵母细胞内，转译的产物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析证明只存在相当于H 链的一个峰 (55,000 道尔顿)，而完全没有 L 链(图 14-12)。(Stevens 和 Williamson, 1974)。这证明用抗体沉淀法分离出的 H 链 mRNA 在功能上有高度的专一性。

总之，上述几方面的实验证明存在 L 链和 H 链的专一的 mRNA。这些 mRNA 是相当稳定的，能在无细胞系统或异源细胞系统内作为样板各自专一地转译成完整的 (包括 V 区和 C 区) L 链和 H 链。这里值得注意的是带 I、II、III RNA 的分子量不同，它们很可能相当于H 链 mRNA 的不同的前体物。

3. H 链 mRNA 在从核到质的转移过程中的“加工”

真核细胞的细胞核内含有高分子量的、代谢率很快的、不均一的 RNA，称为不均一

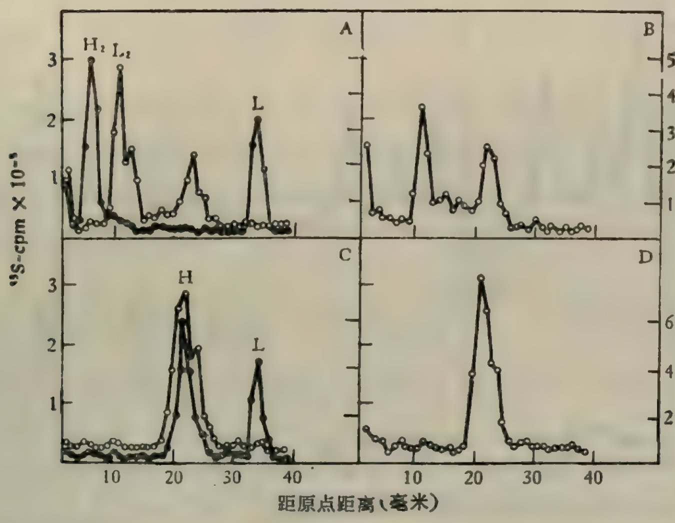


图 14-12 从 5563 骨髓瘤细胞专一地纯化的 RNA 的转译产物。爪蟾卵母细胞注射从带 II 或带 III (图 14-11)纯化的 RNA。卵母细胞在室温培养 24 小时后匀浆，用抗-5563 抗血清沉淀新合成的 5563 蛋白。沉淀用 PBS 洗 4 次，加 ^{3}H 标记的 5563 蛋白作为记号，溶于 2%SDS。此样品分为两部分，一部分用碘乙酸酰胺（0.15*M*）溶解，另一部分在溶解前先经巯基乙醇（0.1*M*）还原。从注射带 II 的 RNA(A,C) 或带 III RNA(B,D) 的卵母细胞得到的经过还原的和未还原的样品，在 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶柱上作电泳分析。电泳后，凝胶切成 1 毫米片段，水解，测放射性。(—∘—)^{35}S；(—·—)^{3}H（据 Stevens 和 Williamson. 1974）。

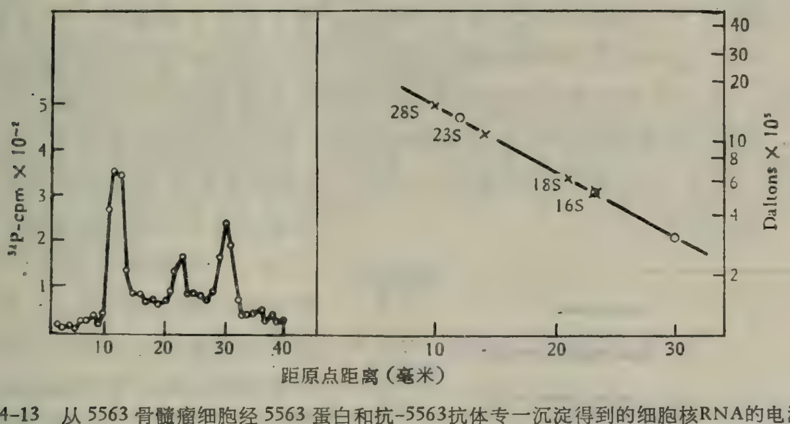


图 14-13 从 5563 骨髓瘤细胞经 5563 蛋白和抗-5563抗体专一沉淀得到的细胞核RNA的电泳图。右图，专一 RNA 带的迁移率和 rRNA 标准品的迁移率的比较，以估计分子量。培养的小鼠骨髓瘤细胞(7×10^6 细胞/毫升)在无磷酸的L-15培液中，含250 微居里/毫升 ^{32}P-正磷酸，保温 5 小时。再和 1% NP-40 在 4℃ 保温 15 分钟后，分离细胞核和细胞质，制备 RNA。将纯化的 RNA 重悬于 0.5 毫升溶液 A 内（0.5m*M* $MgCl_2$,75mm NaCl,20m*M* 磷酸缓冲液，pH7.5)，离心(3000 g，3 分钟)去除聚集的RNA。上清液内加 50 微克纯化的 5563 蛋白，混合物保温 1 分钟。然后，再加适量的抗 5563 抗体，继续保温 2 分钟，离心(3000 g，5 分钟)收集沉淀，用溶液 A 洗两次。沉淀溶于2% SDS，加 ^{3}H-标记的 rRNA 作为分子量标准，在 4% 聚丙烯酰胺凝胶柱上作电泳分析。将凝胶切成 1 毫米长的片段，经浓氨水水解，测放射性强度，得到三个带(据 Stevens 和 Williamson,1974)。

核内 RNA（简称 Hn RNA）。目前有证据表明它们可能相当于转化为细胞质内 mRNA 的一系列前体分子。

Stevens 和 Williamson (1973b) 先用 ^{32}P 短暂地标记 5563 骨髓瘤细胞，并用专一抗体沉淀法从细胞核分离 RNA。这样得到的核内 RNA 在聚丙烯酰胺凝胶柱上分为

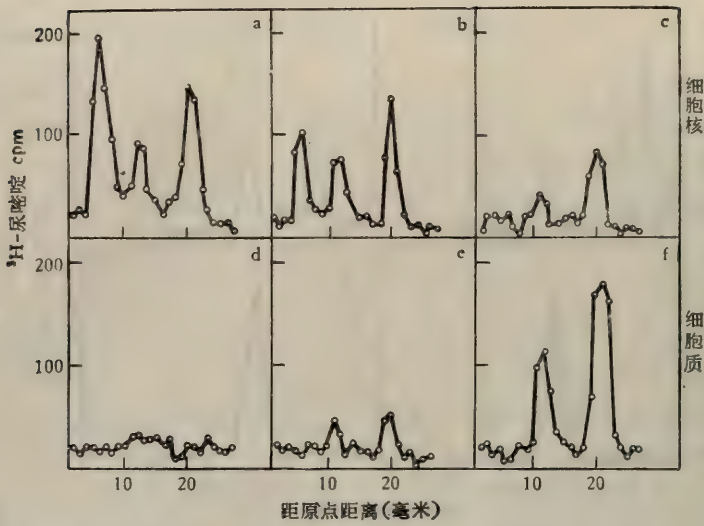


图 14-14 重链 mRNA 前体的合成和转运。5563 骨髓瘤细胞(5×10^5 细胞/毫升)和 ³H-尿嘧啶(200 微居里/毫升，26 毫居里/毫克分子)在 37℃ 保温 20 分钟。加放线菌素D(10 微克/毫升)后，继续保温 30 分钟。在加放线菌素D后，0、15 和 30 分钟取等量的细胞样品。制备细胞核和细胞质 RNA。每一 RNA 样品用 5563 蛋白-抗 5563 抗体处理(如图14-11 所示方法)。沉淀内的专一 RNA 在 4% 聚丙烯酰胺凝胶柱上作电泳分析。a，b，c 代表加放线菌素D后，0、15 和 30 分钟时的细胞核 RNA 样品；d，e，f 代表相应的细胞质 RNA 样品(据 Stevens 和 Williamson，1974)。

三个带。根据迁移率估计分子量，其中两条带(II、III)的分子量大小相当于细胞质内 H 链 mRNA 的大小，并可能带有或不带有 PolyA。带 I 的分子量最大，其分布限于核内存在(图 14-13)。这一结果似乎提示细胞质内的 H 链 mRNA 是先在核内形成的，然后再转移到核外。进一步作脉冲标记竞争实验(先用³H-尿嘧啶标记 20 分钟，再加放线菌素 D 抑制)，发现当细胞经 ³H-尿嘧啶短暂标记后，被抗原抗体复合物专一地沉淀的核内放射性标记 RNA 只在带 I 出现(图 14-14a)。加放线菌素 D 抑制新的 RNA 合成时，便发现带 I 的放射性减弱，同时带 II 和带 III 的放射性增高，不过仍然还留在细胞核内(图 14-14，b)。当保温时间再延长时，相当于这两条带的放射性标记 RNA 便在细胞质内出现了(图 14-14c)。如果将带 I 的 RNA 注射到爪蟾卵母细胞内，就能合成 5563 H 链。这证明其中存在编码重链的 mRNA。所以，这些实验直接证明细胞核内存在 H 链 mRNA 的分子量较大的前体物(带 I)，然后再从核内转移到核外(带 II、III)(Stevens 和 Williamson，1974)。进一步研究发现从 5563 瘤细胞的细胞核分离出的 H 链mRNA前体，至少有 4300 核苷酸单位长，其 3′ 端含有 150—200 核苷酸单位长度的 PolyA链。从细胞质内分离出的 H 链 mRNA 的长度也有约 2000 核苷酸单位，比 H 链编码所需的长度也超出 650 核苷酸单位(图 14-15)。这说明核内的 H 链 mRNA 前体分子在从核内到核外的转移过程中，可能有一个“减短”的“加工”过程

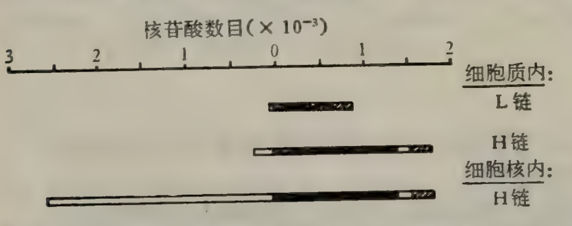


图 14-15 L 链和H链 mRNA之编码长度和实验测得的长度。(■)预想的编码长度 (□)根据分子量测定，附加的核苷酸顺序 (▨)富含 PolyA 的顺序。(据 Williamson，1973)。

(Williamson，1973)。如同图14-6所设想的那样，可以假定从DNA转录下来的H链mRNA（转录本）先在细胞核内被逐渐切成细胞质内mRNA的大小，经短暂停留后再转移到细胞质内。

后来有人利用遗传工程方法，先以κ轻链mRNA作模板通过反转录得到cDNA，再将cDNA和质粒连接转移到细菌内扩增，得到重组DNA。以这种重组DNA作为探测分子，分析核内不均一RNA，结果发现核内存在三类含κ链mRNA顺序的大分子RNA。它们可能按下列顺序：

$$\underset{(\sim 11{,}000\text{ 核苷酸})}{40SRNA} \rightarrow \underset{(\sim 4000\text{ 核苷酸})}{24SRNA} \rightarrow \underset{(\sim 1250\text{ 核苷酸})}{13SRNA} \xrightarrow{\text{进入细胞质内}} \underset{(\sim 1250\text{核苷酸})}{13S\ \kappa\text{ 链 }mRNA}$$

转化为细胞质内的κ链mRNA (Gilmore-Hebert 和 Wall，1978)。这一结果和H链上得到的结论是一致的。

总之，这些实验证明核内不均一的大分子RNA是细胞质内mRNA的前体。这是和在其他真核细胞上得到的证据——核内不均一RNA是细胞质内mRNA的前体——相一致的。这种mRNA前体的"加工"过程，在SV40病毒RNA的转录过程中曾有人加以追溯。不过在细胞核内和细胞质内都分离出同一个确定的信使分子并证实其相互转化的关系，H链mRNA还是第一个例子。

最近，对真核细胞的基因构造(包括免疫球蛋白基因)研究的一个重要发现是在结构基因的内部存在间隔顺序或插入顺序。这种顺序可能在转录过程中，从mRNA前体分子的中段被删去，而不是象过去设想的那样是从分子末端切去一段的简单的"切尾巴"的过程 (Brack 和 Tonegawa，1977；Gilbert，1978；Marx，1978)。关于这一点在免疫球蛋白分子的遗传和进化上的意义下一章还要讲到。

最后，还要提到一个较早期的实验。当把从5563骨髓瘤细胞分离的含L链和H链mRNA注射到爪蟾的卵母细胞内时，发现有L链和H链合成，并且可能装配成完整的IgG分子 (H_2L_2) (Stevens 和 Williamson，1972)。这表明卵母细胞内也可能存在Ig分子装配所需的构造。

三、免疫球蛋白分子的装配、转运和分泌

免疫球蛋白是一个糖蛋白，分子具有四条链 (H_2L_2) 的基本构造，并可以聚合成多聚体。分子是靠L链和H链之间非共价相互作用和特异的二硫键维持构造稳定的。

如前所述，L链和H链是在抗体合成细胞的粗糙内质网上不同的多聚核糖体上分别合成的，然后再装配成完全的抗体分子。分子的装配是在细胞内的合成地点到分泌的转运途中逐步完成的。与此同时，分子上的低聚糖链也逐步延长。多聚体的形成发生得很晚。IgM在细胞内只是以7S亚基形式存在，只有在分泌时或前不久才形成19S的多聚体。

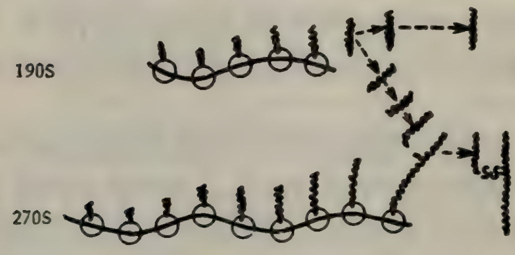
（一）分子的装配

一般认为蛋白质高级结构信息包含在其一级结构之中。然而，分子的装配还受到细

胞内微环境（pH、离子组成和强度、多肽和蛋白的浓度、还原状态、二硫键交换酶的分布等）的影响。此外，一条正在合成中的多肽链达到一系列的稳定构象在热力学上的要求也可能和一个已经完全合成的多肽链有所不同。这些情况说明蛋白质分子在细胞内的装配可能和在离体条件下的拆合有很大的不同，还有许多不清楚的地方。免疫球蛋白具有易于拆合的四条肽链的基本构造，H 链和 L 链在抗原性上易于区别，IgA 和 IgM 还可以聚合成多聚体。由于这些特点，免疫球蛋白是研究多链蛋白质分子装配和聚合的好材料。

1. 多聚核糖体上肽链的装配

已知 H 链和 L 链是在大小不同的多聚核糖体上分别合成的。然而，游离的 H 链很容易自行聚集。因此，有人假定当重链的合成还正在进行的时候，游离的 L 链就可能和还位于多聚核糖体上的 H 链结合，结果 H 链是以和 L 链的复合物的形式，而不是以易于形成聚集物的游离 H 链的形式从大的多聚核糖体上释放出来。也就是说免疫球蛋白分子装配在多聚核糖体上就已经开始进行了。这一假定得到多方面的支持。



	脉冲			赶出						
	15	30	90	15	30	45	60	90	120	180 (秒)
L	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+
H	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

L	−	±	+	+	+	+	+	+	±	−
H	+	+	+	+	+	+	±	−	−	−
	15	30	90	15	30	45	60	90	120	180 (秒)

图 14-16 MPC 11 浆细胞瘤之H和L链在多聚核糖体上的装配示意图。MPC11 瘤细胞和放射性氨基酸保温 90 秒(脉冲标记)，然后加大量过剩的非标记氨基酸停止放射性参入(蛋白合成仍继续进行)(“赶出”)，在脉冲标记和赶出的不同时间，用聚丙烯酰氨凝胶电泳检查小多聚核糖体(约 190S)和大多聚核糖体（约 270S）上新生的 L 和H链。上方表格示 190S 多聚核糖体的分析结果，下方示 270S 多聚核糖体的分析结果。中图示新合成的H链和L链在多聚核糖体上开始装配(据 Scharff 和 Laskov, 1970)。

Shapiro 等（1966）对分泌 IgG2b 的小鼠 MPC 11 浆细胞瘤多聚核糖体上新产生的H 链和 L 链出现和消失的动力学做过详细的研究。当用标记氨基酸短促脉冲标记时（15 秒），发现大的多聚核糖体(约 270S）上只有 H 链，而小的多聚核糖体（190S）上只有 L 链存在。但是，当标记时间延长时（>30 秒），大的多聚核糖体上就同时存在标记的 H链和 L 链。这提示新合成的 L 链从小的多聚核糖体上释放出来后，可能转移到大的多聚核糖体上，和正在合成的 H 链结合（图 14-16）。此外，Schubert(1968) 对三种小鼠浆细胞瘤（MOPC 21，ADJPC5，MOPC 104）的研究，也同样发现新合成的 L 链可能和大多聚核糖体上的重链结合(据 Schubert，1968；Schubert 和 Cohn 1968)。为了证实这种可能性，进一步作“脉冲-赶出”（“Pulse-Chase”）实验，即先把瘤细胞和放射性氨基酸一起保温 90 秒(脉冲标记)，然后加大量过剩的非标记氨基酸停止放射性参入(“赶出”)。由于蛋白质合成仍在继续进行，结果经过一段短促的时间后，新产生的非标记的多肽链便会把原来位于多聚核糖体上的标记的多肽链“赶出”去。在开始“赶出”后的不同时间，检查两种多聚核糖体上新产生的 L 链和 H 链，发现标记的 L 链在 30 秒内就从小的多聚核糖体上“赶出”来了，而标记的 H 链大约要在 60 秒才能从大多聚核糖体上

完全“赶出”来。另一方面，开始“赶出”后 120 秒时，大的多聚核糖体上仍然可以测出标记的 L 链(图 14-16)。对于这些结果如何解释呢？可以假定细胞内存在一个处于动态平衡中的游离 L 链库。它一方面由于和大多聚核糖体上正在合成的 H 链结合而不断减少，一方面又从小多聚核糖体上新合成和释放的 L 链得到源源不断地补充。开初，游离 L 链库内完全没有标记的 L 链，因此大多聚核糖体上也找不到标记的 L 链。随着新合成和释放到游离 L 链库内的标记 L 链逐渐增多，大的多聚核糖体上便出现和标记的 H 链结合的标记的 L 链。再往后，当所有标记的 H 链都从大的多聚核糖体上“赶出”时，游离 L 链库内暂存的标记的 L 链仍然可以继续不断地和大的多聚核糖体上的非标记的 H 链结合，直到 120 秒时，游离 L 链库内标记的 L 链耗尽为止 (Shapiro 等，1966)。

后来的确发现所有合成免疫球蛋白的细胞内都有游离的 L 链库存在，但是却很难找

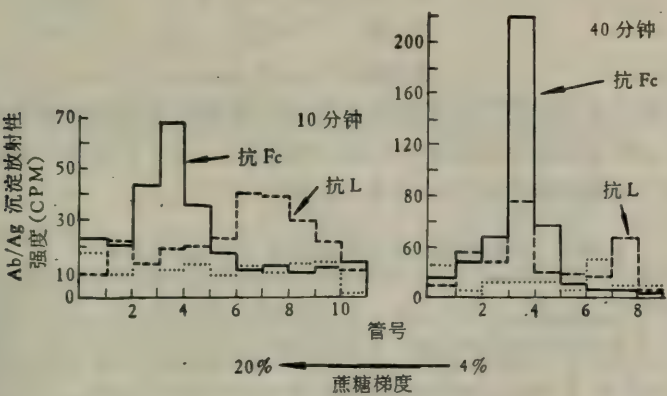


图 14-17 小鼠淋巴结细胞内 ^{3}H-氨基酸对游离 L 链和 IgG 之相对参入量。淋巴结细胞与 ^{3}H-亮氨酸和缬氨酸保温 10 分钟(左)和 40 分钟(右)。制备细胞内可溶性蛋白，蔗糖梯度离心分离，并用抗血清鉴定。(……) 对照抗家兔 IgG 抗血清；(----) 抗 L 链；(——) 抗 Fc，与 IgG 反应强(据 Askonas 和 Williamson, 1967b)。

到游离的 H 链。对免疫小鼠淋巴结细胞，标记氨基酸参入游离 L 链和 IgG 的动态过程的观察发现，在加入标记氨基酸后 5 分钟，细胞内游离 L 链部分和 Ig G 部分的标记量是相同的。但是，在 40 分钟时，Ig G 部分的标记量便显著增高，比游离 L 链部分高 6—7 倍 (图 14-17)。这说明游离 L 链库内的新合成不久的标记 L 链不断转移到新装配的 IgG 分子上 (Askonas 和 Williamson, 1967 b)。此外，当新合成的多肽链被亚胺环己酮“冻结”在多聚核糖体上而不能释放出来时，IgG 分子装配也受到严重的阻碍 (Williamson 和 Askonas, 1968)。离体实验也有证据提示 ^{131}I 标记的 L 链能选择地和含新合成 H 链的大多聚核糖体结合 (Askonas 等，1969)。

总之，所有这些实验都支持 Ig 分子的装配在多聚核糖体上就已经开始进行了。新合成的 L 链先释放到细胞之迅速更新的游离 L 链库内，然后再和大的多聚核糖体上的H链结合(至少在上述四种浆细胞瘤是如此)。有人还发现在 MOPC21 骨髓瘤细胞，Ig G 分子在多聚核糖体上装配时，链间二硫桥已开始形成，甚至完全形成了 (Schubert 等，1968)。但是，在其他的细胞里新产生的 L 链和 H 链间却找不到二硫键 (Scharff 和 Laskov, 1970)。实际上，后来的实验证明重链和轻链在多聚核糖体上的装配虽已开始进行了，但在量上只占少数，大多数非共价结合和几乎全部的共价结合是在这些链从多

聚核糖体上释放出来后才形成的（Baumal 和 Scharff，1973）。

2. 链间二硫键形成的顺序

对链间二硫键形成顺序的研究可以阐明 Ig G 分子装配的后来的步骤。从 IgG(H_2L_2) 的分子构造看来，理论上这一个四条链共价结合的分子可能有三条装配途径：

(A) ① $H + L \rightarrow HL$

② $HL + HL \rightarrow H_2L_2$

(B) ① $H + H \rightarrow H_2$

② $H_2 + L \rightarrow H_2L$

③ $H_2L + L \rightarrow H_2L_2$

(C) ① $H + L \rightarrow HL$

② $HL + H \rightarrow H_2L$

③ $H_2L + L \rightarrow H_2L_2$

对人和小鼠各种骨髓瘤细胞之免疫球蛋白链间二硫键形成的动力学研究发现，细胞内和细胞外存在着各种各样的部分装配的中间产物(表 14-2)。从这里可以看出，不同的骨髓瘤细胞，链间二硫键形成的顺序可能是不同的。

表 14-2 小鼠骨髓瘤细胞合成和分泌的 IgG 及中间产物

细胞	免疫球蛋白亚类	细胞内							细胞外						克分子比值(L/H)	
		H_2L_2	H_2L	H_2	HL	H	L_2	L	H_2L_2	H_2L	HL	H	L_2	L	细胞内	细胞外
MOPC21	IgG_1	+			+	+		+	+						2:1	1:1
MOPC31B	IgG_1	+			+	+	+	+	+						–	–
5563	IgG_{2a}	+	+	+				+	+						~1:1	1:1
MOPC173	IgG_{2a}	+	+	+	+			+	+						–	–
MOPC494	IgG_{2a}	+	+	+	+			+	+					+	–	~1:1
MPC11	IgG_{2a}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3—4:1	3—4:1
MPC11(培养)	IgG_{2a}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1.5—2:1	1.5—2:1

(据 Scharff 和 Laskov，1970)。

虽然在一种小鼠骨髓瘤 MOPC 21，所有或几乎所有链间二硫键在多聚核糖体上就已经形成了（Schubert 等，1968），但是其他种类的瘤细胞，至少一部分，甚至几乎全部二硫键是在肽链从多聚核糖体上释放下来后才形成的。如 MPC 11 骨髓瘤细胞，先用放射性氨基酸标记 $2\frac{1}{2}$ 分钟，再加亚胺环己酮抑制多聚核糖体上新合成的肽链的释放。结果在 10 分钟内仍能继续形成链间二硫键。这表明在 MPC 11 瘤细胞几乎所有的链间二硫键是在肽链从多聚核糖体释放后才合成的。因此，对于不同的瘤细胞，链间二硫键形成的顺序是明显不同的。根据现有的研究资料大体说来，小鼠 IgG_{2a} 和 IgG_{2b} 的装配途径是不同的。已经研究过的三种产生 IgG_{2a} 的骨髓瘤细胞，分子装配过程是先形成 H 链间的二硫键，然后才发生 H 链和 L 链间的共价连接（B 途径）。例如，产生 IgG_{2a} 的 AdJPC-5 骨髓瘤，在“赶出”后 4 分钟，可测出相当大量的 L，H，H_2和 H_2L 中间产物。后来在 18 分钟时，这些中间产物已大部分装配成 H_2L_2，这说明分子二硫键形成的顺序是按照 B 途径进行的（图 14-18）（Baumal 等，1971）。另一方面，一些培

养的骨髓瘤细胞，如 MOPC 31 B（IgG_1）、MOPC 21（IgG_1）和 MOPC 11（IgG_{2b}）似

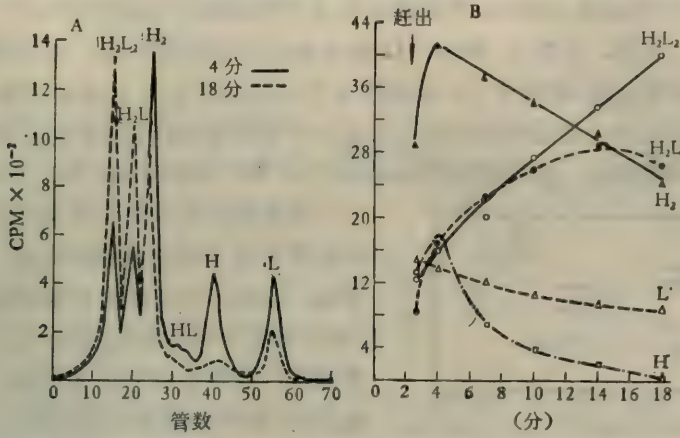


图 14-18 小鼠 AdjPC-5 骨髓瘤 IgG_{2a} 共价装配的途径和动力学。（A）脉冲标记和"赶出"后，4 分和 18 分时，细胞提取液经抗小鼠 H 和 L 链抗血清沉淀物之凝胶电泳图。（B）"赶出"后不同时间，免疫球蛋白合成之各种中间产物的量随时间的变化（据 Baumel 等，1971）。

乎是先形成 HL 间的二硫键，然后再和两条 H 链共价连接（途径 A）。不过，这并不是绝对的，其他二硫键形成途径也可能在一定程度上表现出来。例如，MOPC 173 和 MOPC 494 瘤细胞的二硫键形成的主要途径是通过 H_2 和 H_2L 中间产物（B 途径），但是也可能形成小量的 HL 半分子，并装配成完整的 H_2L_2。总之，小鼠各种 IgG 分子装配途径是不同的。已知小鼠 IgG 各亚类的结构，包括链间二硫键的数目和位置有明显的不同（参看第七章，图 7-6）。上述分子装配途径的不同也许可能和 IgG 各亚类结构的不同有关系。

3. IgM 的分子装配

IgM 在细胞内的装配过程还不太清楚。不过有证据指出7S IgMs 亚基的聚合是在分泌时或分泌前不久才发生的。这时"J"链也加入到新聚合的多聚体分子中（参看第八章，232 页）。从细胞内分离出来的 IgMs 亚基，除非事先经过还原剂处理，不能自发地聚合。这提示和亚基间连接有关的半胱氨酸残基在细胞内是处于封闭状态的（Parkhouse，1973；1974）。

（二）转译后的改变

已装配完的免疫球蛋白，在运输过程中其肽链还要发生一些改变，并逐步加上低聚糖链，才能分泌到细胞外面去。

1. 肽链顺序的改变

5563 浆细胞瘤产生的一种免疫球蛋白（IgG_{2a}）在合成后到分泌出细胞以前，分子的电荷性质还要发生改变。用等电点聚焦法分析脉冲标记的免疫球蛋白，发现细胞内的前体蛋白(o)，在分泌到血清内时，就转变成等电点（pI）较低的免疫球蛋白（a）（图 14-19a）（Awdeh 等，1970）。有证据表明这种电荷变化不是由于 N 末端的谷氨酸环化形

成封闭末端的结果，而是由于肽链顺序有改变。

MOPC 21 浆细胞瘤的 mRNA 在网织红血球无细胞蛋白合成系统中，能合成 L 链的较长的前体物。但是，当加入 Kreb II 腹水瘤的上清液因子时，N 末端外加的一段多肽（14—15 氨基酸残基）就消失了。L 链前体在细胞内转化为 L 链进行得很快。在无细胞蛋白质合成系统中，加从微粒体部分制备的多聚核糖体时，能合成 L 链前体物(P)；当加细胞的微粒体部分时，就只能形成 L 链(图 14-19)（Milstein 等，1972)。

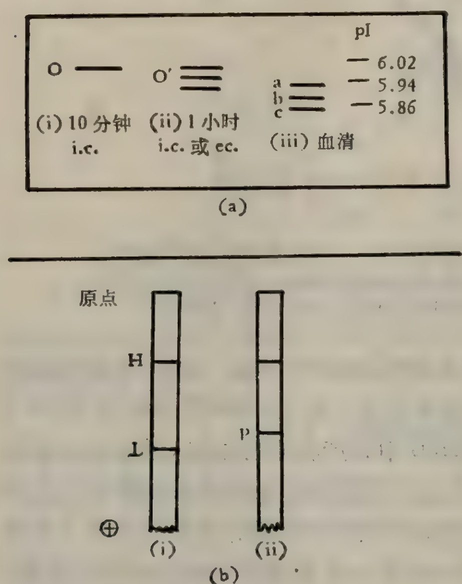


图 14-19　L 链前体在转译后的改变。(a) 等电点聚焦示 IgG5563 前体及其转化为血清 5563 蛋白。5563 细胞标记不同时间后，^{14}C-标记髓细胞瘤蛋白等电点聚焦图谱：(i) 10 分钟，细胞内的蛋白 (i.c.)；(ii) 1 小时，细胞内 (i.c.) 或细胞外(e.c.)；(iii) 带瘤动物血清内髓细胞瘤蛋白(据 Awdeh 等，1970)。(b) MOPC21 L 链前体之体外合成，无细胞系统内合成的 Ig 链：(i) 加 P3 细胞的微粒体部分；(ii) 加从 P3 细胞微粒体制备的多聚核糖体。^{35}S-标记合成产物在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上的电泳图形(据 Milstein 等，1972)。

后来的研究发现 L 链前体物 N 端的额外肽段含有大量的亮氨酸残基，非极性程度很高。因此，可以假定 L 链前体的非极性额外肽段易于和内质网膜层结合，并可能和免疫球蛋白的转运和分泌有关系。当到达分泌地点时，额外肽段被切除的分子，便脱离膜层而被分泌出去。少数不被切除的分子继续埋在膜层内，被带到细胞表面成为抗原受体（Schechter 和 Burstein，1976)。

2. 糖的参入

各类(或亚类)免疫球蛋白具有特异的低聚糖链。放射性标记糖分子参入浆细胞内免疫球蛋白的动力学研究，表明糖残基是在免疫球蛋白的合成、释放、转运和分泌的过程中，逐步加添到免疫球蛋白分子上的。

各种糖残基参入浆细胞内正在合成和转运的免疫球蛋白的地点和时间是不同的。对于产生 IgG 的浆细胞瘤，有人发现 ^{3}H-氨基葡萄糖能和还留在多聚核糖体上的肽链共价结合（Sherr 和 Uhr，1969)。^{3}H-氨基葡萄糖、^{3}H-甘露糖、^{3}H-半乳糖都能标记细胞内的和分泌的免疫球蛋白，而 ^{3}H-岩藻糖只能标记分泌的，而不能标记细胞内的免疫球蛋白。这提示岩藻糖是在免疫球蛋白分泌的最后阶段才加上去的（Melcher，1970)。同样地，^{3}H-唾酸标记的免疫球蛋白分子在细胞内、外同时出现。这提示位于低聚糖链末端的糖残基是在免疫球蛋白分子离开细胞前才加上的。总之，这些事实表明低聚糖链不是作为一个整体加入到免疫球蛋白分子上去的，而是在免疫球蛋白合成、转运和分泌的过程中，在内质网的不同部位上，逐步增添、加长的。氨基葡萄糖、甘露糖是在粗糙内质网上就最早加上的，部分半乳糖和神经氨酸是在平滑膜上加上的，而其余的半乳糖和神经氨酸以及大部分岩藻糖是在临分泌时才加上去的(图 14-20)（Melcher，1973)。

糖参入 IgM 的过程大体上也是和 IgG 相似的。对于产生 IgM 的浆细胞瘤，甘露糖和氨基葡萄糖同样是在分泌过程的早期就加入 IgM 分子的，而半乳糖和岩藻糖是在 IgM 离开细胞时或前不久才加上的。糖参入 IgM 和 IgG 的主要不同点也就在于半乳糖加入

的时间，以及 IgM 糖总量的 35—40%是在分泌时或前不久才加到多聚体分子上的，也就是说在从 IgMs 单体聚合为多聚体时才发生的（Parkhouse 和 Melcher，1971）。

对于分离的浆细胞各亚细胞成分内 L 链糖组成的分析发现，粗糙膜部分的 L 链含有 3GlcNAc 和 4 Man 残基，平滑膜部分的 L 链含有 3GlcNAc、4Man、2Gal 和 0.5 Fuc 残基，而分泌的 L 链则含有全部的糖组分，即 3GlcNAc、4Man、4Gal 和 2 Fuc残基。平滑膜和分泌的 L 链上含有不等量的 NGNA（0，1 或 2 残基），而粗糙膜部分则完全没有*。从这些结果可以得出结论，各种糖基转移酶可能分布在不同的亚细胞成分上：GlcNAc 和 Man 转移酶位于粗糙膜部分，Gal 和 NGNA 转移酶位于平滑膜部分，而 Fuc 转移酶位于细胞膜上。这些结果也支持上述标记糖分子参入动力学得到的结论(Melcher，1971，1973；Knopf，1973)。

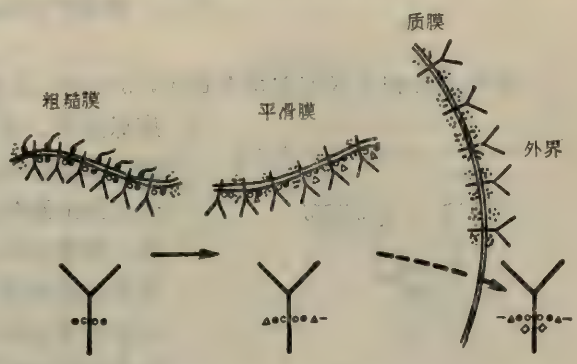


图 14-20 免疫球蛋白在细胞内的分布、转运和糖基团加添的示意图。免疫球蛋白是在和粗糙内质网膜结合的多聚核糖体上合成的。一部分正在加长的多肽链，在从多聚核糖体上释放出来以前，就可能获得氨基葡糖残基（c），而大多数免疫球蛋白分子是在进入粗内质网的嵴池中，才加上氨基葡糖(○)和甘露糖(●)残基。免疫球蛋白分子然后转运到类似高尔基氏体的平滑膜构造内，在该处再加添上半乳糖(◊)和神经氨酸(－)。分泌的免疫球蛋白上的糖残基已经齐全，包括全部的甘露糖、氨基葡糖、半乳糖、神经氨酸和岩藻糖(△)残基。膜结合的免疫球蛋白受体上的糖组成还不清楚（据 Melcher，1973）。

至于糖残基的添加和免疫球蛋白分泌过程的控制之间的关系，目前还不太清楚。糖残基的添加可能调节免疫球蛋白分子在细胞内的转运和分泌，或者这可能仅仅反映内质网不同部分糖基转移酶的分布。有实验表明 2-脱氧-D-葡萄糖能抑制新合成的 Ig G_1肽链从粗糙内质网的多聚核糖体上移动到嵴池中，以及 IgG_1从粗糙膜移动到平滑膜，但不能抑制 IgG_1的分泌。已知 2-脱氧-D-葡萄糖能抑制糖残基加入 IgG_1。因此，糖残基加入 IgG_1似乎可能和 IgG_1从粗糙膜到平滑膜的转运有关系，但和分泌无关（Melchers 和 Andersson，1973）。然而，有的骨髓瘤细胞能分泌不含糖的 L 链（Parkhouse 和 Melchers，1971）。这又似乎说明糖的参入和免疫球蛋白肽链的转运和分泌无关。总之，这还是一个需要进一步研究的问题。

最后还要提到低聚糖链的合成(糖残基的加添)并不是象肽链合成那样受遗传信息严格控制的过程，因而免疫球蛋白的糖含量可能有变动。这反映在血清免疫球蛋白糖含量呈现的微小不均一性。例如，人 IgG 骨髓瘤细胞的 Bence-Jones 蛋白和正常 IgG L 链的区别仅在于唾酸含量，每一条 L 链只含一个唾酸，而每一条 Bence-Jones 链则可能含有 1—6 个唾酸（Spiegelberg 等，1970）。

---

* GlcNAc 示 N-乙酰-D-氨基葡萄糖，Man 示 D-甘露糖，Gal 示 D-半乳糖，Fuc 示 L-岩藻糖，NGNA 示N-乙醇酰-神经氨酸。

（三）细胞内转运和分泌

各种浆细胞合成的总蛋白量中，5—40％是免疫球蛋白，而分泌的蛋白质90％是免疫球蛋白。免疫球蛋白合成和分泌的动力学研究发现新合成的免疫球蛋白经过20—30分钟的迟滞期开始分泌到细胞外面，2—5小时后分泌速度便达到稳定态。假定达到分泌稳定态的半寿期（1—3）小时，可以代表免疫球蛋白分子的合成和分泌所需的时间。已知免疫球蛋白肽链的合成很快，只需要1—2分钟，因此绝大部分时间是用在从合成地点转运到分泌地点和分泌上。据计算一个浆细胞含有1×10^6—1×10^7免疫球蛋白分子，分泌速度是每秒分泌50—200分子（Melchers，1973）。

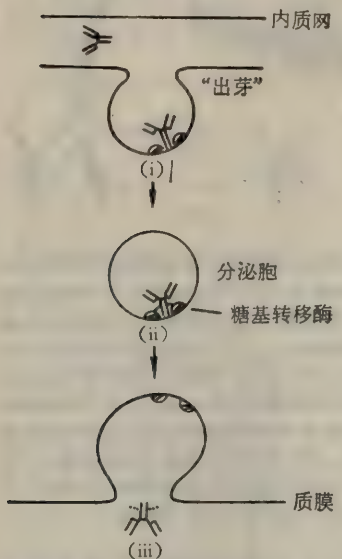


图14-21　IgG 在细胞内转运和分泌的模型。(i) 含 IgG 的分泌胞从内质网上“出芽”脱离，假定此步骤需能量。 (ii) 和膜结合的糖基转移酶的催化下，低聚糖链逐渐加长。 (iii) 假定通过反向饮液作用，将 IgG 分泌到细胞外（据 Williamson, 1973）。

分泌免疫球蛋白的浆细胞具有和其他分泌蛋白质的细胞同样发达的内质网。放射性标记氨基酸和糖的参入动力学实验、亚细胞成分的分部分析（Melchers，1971；Choi等，1971）以及电子显微镜放射自显影示踪（Zagury 等，1970）等研究也表明免疫球蛋白的分泌方式和其他分泌蛋白质的细胞大体上是相似的。新合成和正在装配的免疫球蛋白分子，从粗糙内质网进入到平滑内质网，并通过“出芽”形成囊泡。这些充满装配好的免疫球蛋白分子的囊泡，汇集在细胞的高尔基体区域，移动到细胞表面和细胞膜融合，并可能通过反向饮液作用，将包含的免疫球蛋白分泌到细胞外。在囊泡形成和移动的过程中，在和膜结合的糖基转移酶的催化下，免疫球蛋白的低聚糖链继续加长（图14-21）（Williamson，1973）。

关于免疫球蛋白转运和分泌的机制还不甚清楚。已知转运过程的某一步骤（可能为“出芽”）是需要能量的，可被各种能量抑制剂或低温阻遏。不过，亚胺环已酮(蛋白合成抑制剂)对分泌并无不利影响(图14-22)（Baumel 和 Scharff，1973）。抗体合成细胞产生的免疫球蛋白或者参入细胞膜构造，作为抗原受体；或者分泌到细胞外，作为体液抗体。细胞如何控制这两种不同的途径，目前也不清楚。有人认为可能主要取决于H链和L链在膜上合成的地点。免疫球蛋白肽链mRNA的非转译部分或H链和L链前体的额外肽段可能和粗糙膜一定部位有选择亲合力，从而决定它们将来的命运（Williamson，1973）。

四、免疫球蛋白合成的调节

在合成免疫球蛋白的正常细胞中，L链和H链的合成是平衡的。在某些病理条件

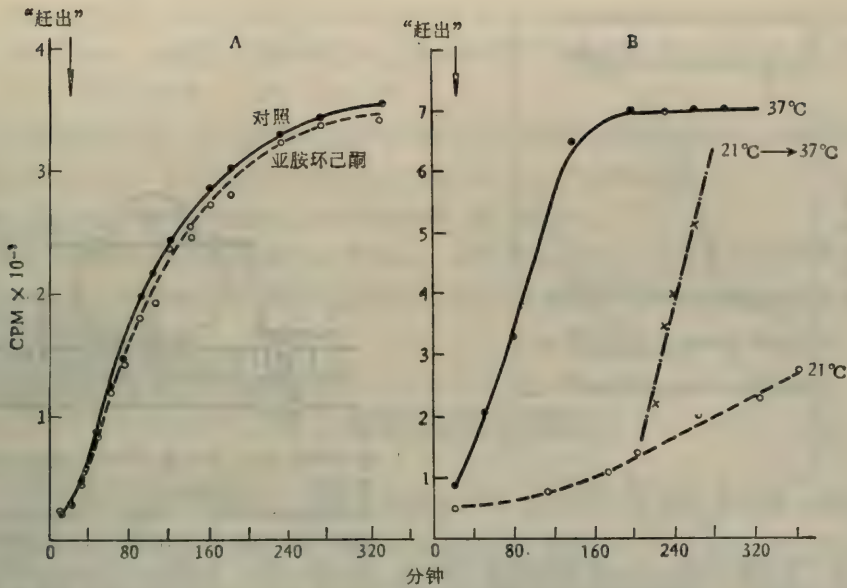


图 14-22 亚胺环己酮和低温对离体培养的小鼠 MPC-11 骨髓瘤细胞株的影响。MPC-11 (1×10^6 细胞/毫升)加 ^{14}C-氨基酸在 37℃ 保温，并加过量非标记氨基酸"赶出"。(A)"赶出"后 2 分钟,加亚胺环己酮(300 微克/毫升)。(B)"赶出"后 3 分钟，取出一部分细胞移至低温 (21℃),200 分钟时再从低温(21℃)保温的细胞中取一部分细胞移回到常温(37℃),比较几种情形下，可沉淀的分泌的 Ig 的放射性(据 Baumal 和 Scharff, 1973)。

下，肽链合成的调控机制受到破坏，结果产生过量游离的轻链分泌到血和尿内，即所谓的 Bence-Jones 蛋白。重链和轻链合成的协调是如何维持的呢？理论上这种调控机制可能作用于不同的水平，重链和轻链基因激活的数量，相对的转录或转译速度和效率等。不过，目前发现 H 链 mRNA 的转译直接受细胞内 H_2L_2库的反馈调节，因此在正常条件下这种调控很可能主要发生在转译水平。

(一) 肽链合成速度的调控

Stevens 和 Williamson (1973) 发现 5563 浆细胞瘤的重链合成存在转录水平的调控机制，细胞内 H_2L_2库增高时，H 链合成便专一地降低。将 5563 瘤细胞置于 25°C 低温保温，H_2L_2的分泌便受到抑制，而 H 链和 L 链的合成仍能部分地继续进行（相当于 37°C 时的 40—50%)，结果细胞内库存的 H_2L_2增高。当回复到 37°C 时，L链合成很快就恢复到正常速度，而 H 链合成却明显地受到抑制，要经过 60 分钟才能恢复到正常的合成速度(图 14-23)。反之，若用亚胺环己酮抑制蛋白质合成而不影响分泌，使 H_2L_2库耗竭时，H 链的合成速度便增加。由此可见，细胞内 H_2L_2 库的大小可以反馈调节 H 链的合成速度 (Stevens 和 Williamson, 1973 b,c)。还可以进一步假定 H 链 mRNA 上存在和 H_2L_2专一的结合点，并且 H_2L_2控制 H 链合成速度可能是靠 H_2L_2和 H 链 mRNA间的专一的相互作用来实现的。虽然这种相互作用是很弱的，但其专一性已得到可用这一办法来纯化 H 链 mRNA 的事实所证实(见 444 页)。

H_2L_2和 H 链 mRNA 在细胞内相互作用的方式还不清楚。H 链 mRNA 的转译是在

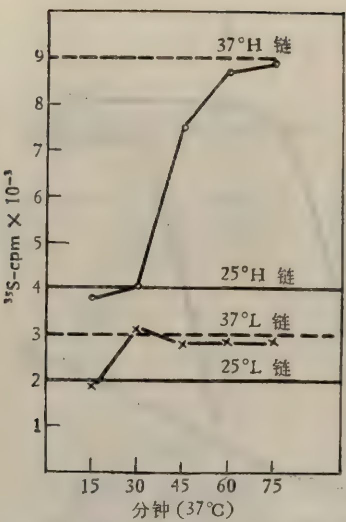


图 14-23 在 25°C 保温细胞内 H_2L_2 增高后又回到 37°C 时，H 链和 L 链合成的恢复。骨髓瘤细胞在 25°C 保温 90 分钟。然后将温度升高到 37°C，每隔 15 分钟取样品，和 ^{35}S-甲硫氨酸 (50Ci/ml) 保温，从各样品的细胞质提取液沉淀出 5563 总蛋白。样品经过还原，烷基化，在聚丙烯酰胺凝胶电泳上测 H 链和 L 链的放射性(据 Stevens 和 Williamson, 1974)。

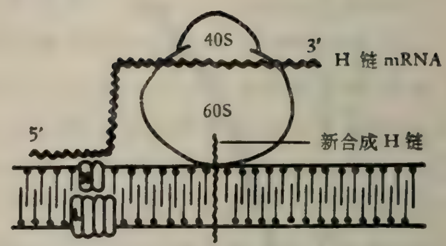


图 14-24 H_2L_2 和H链 mRNA 在体内相互作用的模式图。一个免疫球蛋白分子插人带有合成H链的多聚核糖体的膜内。H链的C端和H链 mRNA 在膜的一侧直接接触，而抗原结合位点则暴露在膜的另一侧。H_2L_2 和H链 mRNA 的结合点假定是靠近H链 mRNA 转译的起始点(5′ 端)(据 Stevens 和 Williamson, 1974)。

和膜结合的多聚核糖体上进行的，新产生的 H 链释放到内质网的嵴池中，这些 H 链因而和位于多聚核糖体上的 H 链 mRNA 是处于膜的两侧的，或者说，是被膜隔开的。因此，假定当细胞内 H_2L_2 库增高时，一部分 H_2L_2的 Fc 部分便可能穿过膜层和 H 链 mRNA 的起始端结合，从而抑制 H 链的合成（图 14-24）(Stevens 和 Williamson, 1974)。总之，H_2L_2和 H 链 mRNA 的相互作用提供了一个在转译水平反馈调控的模型。除此以外，在 DNA 水平、转录水平、mRNA 加工和转运水平是否也存在调控机制，这仍然是需要进一步研究的地方。

（二）免疫球蛋白合成的失控和分子病

许多有遗传缺陷的浆细胞瘤株，其结构基因发生缺失或突变，或者基因表现不平衡，结果导致免疫球蛋白分子装配的异常。这些天然产生的免疫系统的分子病，为了解免疫球蛋白合成的调控提供了很好的研究材料。

在 L 链和 H 链合成不平衡的情形下，总是倾向于 L：H 的比值增加，呈现从 L 链略占优势到 H 链的合成完全被抑制的一系列中间状态（Potter，1972）。当 L 链合成占优势或者只合成 L 链时，细胞就可能大量分泌 L 链，并且在血液和尿内出现 Bence-Jones 蛋白。

虽然 H 链合成被抑制的情形较常见，而 L 链合成被抑制的情形却极其罕见。只是在人类的“重链病”才见到 L 链的明显缺少。在这些“重链病”病人的尿中，出现结构上有缺损的游离的重链（α、γ 或 μ 链）。对这些异常的 H 链的多肽顺序分析发现，它们的内部结

构往往有同时包括一大段V区和相邻的C区的缺失（Frangione 和 Milstein，1969；Terry 和 Ohms，1970）。这种缺失有力地提示在这些发生突变的细胞内V、C基因可能是整合为一体的(参看下一章，497 页)。

由于重链的缺损，也可能造成免疫球蛋白分子装配的异常。例如，有的骨髓瘤细胞只分泌 HL 半分子，而不能装配成完全的 H_2L_2 分子（Mushinski，1971）；另一些缺损的 α 链，则不能和任何 L 链结合（Seligman 等，1969）。

在淋巴球增生、全身性红斑狼疮等病人，IgM 聚合受阻，导致以 7S IgMs 亚基形式分泌到血液中（Solomen 和 McLaughlin，1970）。聚合作用被阻遏的原因以及和有关疾病的关系也都不清楚。

五、基因表现的调控

从根本上讲，各种类型的免疫反应都依赖于淋巴细胞内编码免疫球蛋白的结构基因的选择性表现。肿瘤免疫、移植免疫以及过敏性疾病等医学实践都希望产生有利的，而避免不利的抗体和免疫反应，也就是希望能够定向地控制淋巴细胞的基因表现。因此，淋巴细胞基因表现调控的研究，在实践上潜在的重要意义是显而易见的。目前，对于淋巴细胞基因表现的调控的分子机制所知甚少，这里只能就几方面现有的知识，作一个简略的介绍。目的是把问题提出来。

（一）细胞周期内基因表现的变化

对于一株连续培养的人双倍体淋巴细胞诱导同步分裂，再研究细胞周期不同阶段的免疫球蛋白合成量，实验结果发现在晚G1期和早S期的合成量最高（图 14-25）（Huang 和 Moore，1969）。由于H链和L链 mRNA 的寿命没有测定，还不能确定免疫球蛋白合成量的这种周期性变化是在转录或转译水平调节的。另一方面，一种小鼠骨髓瘤细胞（来源于 MOPC 21 的 P3 细胞株）其染色体是异倍体，在细胞周期中 ^3H-赖氨酸参入免疫球蛋白的速度却几乎是恒定不变的，不呈现周期性变化（Cowan 和 Milstein，1972）。有人曾证明中国田鼠双倍体细胞的酶合成量呈现周期性变化，而异倍体的田鼠 G3细胞株则不呈现这种变化（Klevecz，1969）。

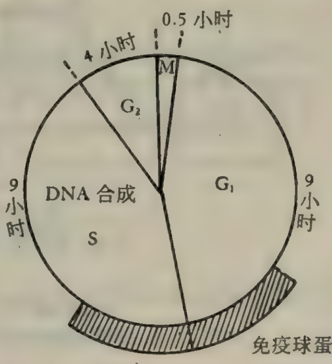


图 14-25　分泌免疫球蛋白的人淋巴球的细胞周期，示从晚 G1 期到早 S 期免疫球蛋白合成量高（据 Finegold 等，1968）。

因此，可以推测上述两株细胞的区别或许可能是双倍体和异倍体细胞的一种普遍区别的反映。

值得指出的，正常分泌抗体的浆细胞是可能停顿在 G1 期的，不分裂的终末细胞，因而能保证抗体的旺盛合成。

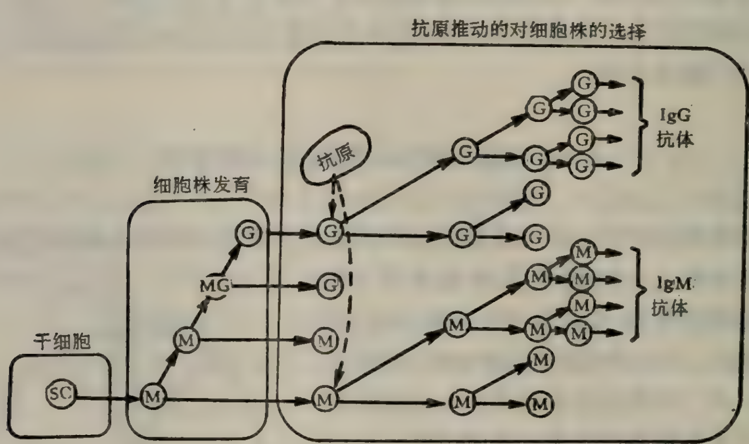
（二）B 淋巴球发育过程中基因表现的改变

已发现的编码免疫球蛋白的结构基因(V,C 基因)的数目正在不断增加。以人类重链的 C 基因为例，至少有 10 种：$C_{\mu1}$ $C_{\mu2}$，$C_{\gamma1}$，$C_{\gamma2}$，$C_{\gamma3}$，$C_{\gamma4}$，$C_{\alpha1}$，$C_{\alpha2}$，C_{δ}，C_{ε}（参看下一章，482页）。B淋巴球在发育过程中和与抗原接触后的扩增过程中，重链 C 基因按顺序地和选择地进行转录。

根据 Cooper 等人的研究结果，B 淋巴球在发育和与抗原接触后的扩增过程中的基因表现可分为三个阶段：

1）和抗原接触前的分化。来源于卵黄囊的造血干细胞，进入法氏囊(鸟类)或相当于法氏囊的器官（哺乳类胎儿肝脏）（Owen 等，1974），受到该处诱导因子的影响便开始分化为 B 细胞。同时，C_{μ} 基因被激活，以相当低的速度合成 IgM，加入到细胞表面，作为抗原受体；

2）依赖抗原的分化。B 细胞表面的抗原受体和专一抗原结合，刺激 B 细胞进一步的增生、分化。B 细胞合成 IgM 的量增加，并分泌到细胞外；同时，其他 C_{γ}，C_{α}，……



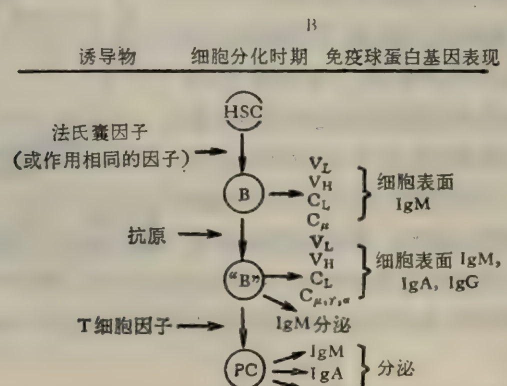


图 14-26 （A）B 细胞株各发育阶段的理论模型(据 Cooper 等，1972)。（B）B 细胞分化过程中免疫球蛋白基因表现的理论模型 HSC，造血干细胞，PC，浆细胞（据 Warner 和 Harris，1973)。

等基因也可能有轻度的表现，结果B细胞表面可能出现其他种类的免疫球蛋白受体；

3）进一步在T辅助细胞(及巨噬细胞)的影响下，B细胞之C_γ，C_α，或C_μ等基因中，只有一种被选择地加强表现，产生相应的IgG，IgA，或IgM等抗体，结果最后转化为只分泌一类抗体的浆细胞(图14-26)（Warner 和 Harris 1973；Cooper，1972；1976)。

以上这些看法，最先是根据鸟类上的实验得出的。哺乳类B淋巴球分化和扩增过程中，C_μ、C_γ和C_α基因同样是按顺序地转录的。这方面的主要证据是，初生期小鼠注射抗μ链抗体后，所有各种成熟阶段的B细胞都被抑制（Lawton 和 Cooper，1974)。假设基因表现的转换是按IgM→IgG→IgA 顺序进行，注射抗γ抗体则应抑制IgG和IgA产生，而不抑制IgM。可是迄今只有一个实验得到这样的结果。因此，还需要进一步的研究，才能断定B细胞基因表现是按上述顺序进行的，还是按另一种可能的顺序 Ig M → IgG → IgA 进行的。

B 细胞株的发育和扩增过程中，为了保持抗体对抗原的结合专一性，在C基因按顺序转录的同时，还必须只专录一种V基因(即产生一种个体型决定簇的抗体)。这方面最有力的证据是发现人类同一骨髓瘤(Til)分泌两种免疫球蛋白（IgM和IgG)，然而它们却具有相同的个体型决定簇。并且γ_2链和μ链的V区有相同的排列顺序（Wang 等，1970)。此外，萤光双标记抗体也显示出家兔淋巴细胞的C_γ和C_μ基因在同一细胞上可能同时表现(Pernis 等,1971)。这些证据有力地支持在B细胞株发育的一定时期,B细胞可以从合成一类免疫球蛋白转变为合成另一类免疫球蛋白，同时还保持转录相同的V基因。

同样地，可以设想编码IgD，IgE的C基因（C_δ，C_ε）在B细胞分化和扩增过程中是按同样的方式激活的。近来，在脐带血内的淋巴球表面同时测出IgM和IgD(Rowe等，1973)，这提示C_δ基因的激活也发生得很早。

B淋巴球分化过程中,法氏囊(或相当的器官)内诱导因子的性质，各类淋巴球（包括亚群)间相互作用的本质，以及C基因表现的更递的机制等问题，都还不清楚，需要在分子水平作深入的研究。

（三）杂交细胞的基因表现

近年来，用病毒引起细胞融合形成杂交细胞和异核体的方法研究高等动物细胞的基因表现和进行遗传分析，取得很大的成功。

Periman (1970) 最先发现一种产生免疫球蛋白的小鼠骨髓瘤细胞(MOPC 315)和不产生免疫球蛋白的L细胞(C 11 D 亚系)融合后得到的杂交细胞，能继续产生和分泌少量免疫球蛋白。不久，有人从BALB/c骨髓瘤细胞和C57Bl/6n淋巴瘤细胞的杂交细胞株，分离出13个细胞株，其中11个细胞株只合成游离的κ链，另2个细胞株能合成和BALB/c相同类型的IgG和游离的κ链。后2个细胞株的染色体数目要比那些只合成游离的κ链的细胞株偏高（Mohit，1971)。

对于一个杂合子动物，一个免疫球蛋白分子中，两条轻链和两条重链，各自具有相同的同族异型决定簇，而不会出现杂种分子。这表明一个抗体形成细胞中，重链或轻链

基因座的许多等位基因中，只有一个被选择地激活。这种等位基因互斥现象（Allelic exclusion）是抗体合成的基因表现的一个特点。细胞杂交方法也可以用来分析此一问题。有人将产生免疫球蛋白的两个异种的细胞株（小鼠 AdJPC5，产生 IgG_{2a} 和游离 κ 链；大鼠 S 210，产生游离 κ 链）进行融合，研究杂交细胞之 V、C 基因的表现，结果发现这些细胞能分泌双亲类型的免疫球蛋白。同时，还出现免疫球蛋白的杂种分子。这表明在同一个杂交细胞内，双亲的 H 链和 L 链的基因都能表现出来（Cotton 和 Milstein，1973）。后来，用同一物种（小鼠）的两种骨髓瘤的杂交细胞也证实了上述结果（Köhler 和 Milstein，1975）。因此，这些结果表明在杂交细胞中，一种轻链（或重链）的表现并不妨碍另一种轻链（或重链）的表现。与上述相似，从人淋巴细胞和小鼠骨髓瘤细胞得到的杂交细胞，能合成人 γ、α 重链和轻链，以及小鼠 α 重链和轻链，并且这些链还能装配成杂交分子（Schwaber 和 Cohen，1974）。这些结果都表明在杂交细胞内，Ig 链的合成不受等位基因互斥的限制。对这些似乎例外的现象，最简单的解释是 V 和 C 基因表现的限制——等位基因互斥现象，是由于在胚胎发育早期，亲代细胞中的 V、C 基因通过移位机制，早已经整合为一个基因了（参看下一章，485 页）。B 细胞当被抗原激活时，只有整合的 V-C 基因能表现，而其他未整合的基因（包括另一单元染色体）则不能表现。于是，便产生等位基因互斥现象。至于在杂交细胞中，来自两个亲代细胞的，已整合的 V-C 基因均能独立地表现出来。换句话说，对一个细胞内等位基因表现的限制发生在 V-C 基因整合阶段；已整合的 V-C 基因则能各自独立地表现，不论有无其他类似的或同型的已整合的 V-C 基因存在（Cotton 和 Milstein，1973）。

细胞杂交还提供了通过体外连续培养的细胞制造指定专一性的抗体的可能性。Köhler 和 Milstein（1975）将经过羊红血球免疫的小鼠脾脏细胞和同一品系小鼠骨髓瘤细胞融合，得到一个能连续培养和分泌抗羊红血球抗体的细胞株。顺便提及，利用病毒转化的抗体形成细胞也可能达到同样的目的。用 SV 40 病毒感染取自经过 III 型肺炎球菌疫苗高度免疫的家兔脾脏的离体培养的脾脏细胞。感染 114 天后，从转化的细胞中分离出一个细胞株，能大量产生抗肺炎球菌 S-3 抗原的抗体（Collins 等，1974；Strosberg，1974）。理论上，这些方法同样可以应用到培养的人类细胞。利用细胞杂交或病毒转化的人淋巴细胞来得到能产生任何指定专一性抗体的细胞株，并通过大量培养来提供在医学上有应用价值的专一的人抗体。因此，这些理论研究成果在医学和工业上应用的潜力是值得注意的。

最近，有人报告从经过破伤风类毒素高度免疫的人体取得的周沿淋巴细胞，离体条件下用 Epstein-Barr 病毒感染后，分离出 44 个能分泌免疫球蛋白的淋巴母细胞株。其中 7 株细胞连续培养 6 个月以上，并能分泌专一的抗破伤风类毒素抗体。这说明已有实际可能利用这种方法来生产指定专一性的、单株的人抗体（Zurawski 等，1978）。同样地，还有人试图用体细胞杂交来产生专一的抗人黑色素瘤抗体（Koprowski 等，1978）。

六、免 疫 RNA

免疫 RNA（Immune RNA）是指从巨噬细胞或淋巴组织提取的 RNA，它能将细胞的免疫专一性（体液免液或细胞免疫）传递给其他的淋巴细胞。这方面的研究起始于从

巨噬细胞分离的富含 RNA 部分（RNA-抗原片段复合物）能诱导专一的抗体反应(Garvey 和 Campbell，1956)。他们观察到免疫动物肝脏内存在的 RNA-抗原复合物，能保持很强的免疫原性。进一步的研究扩大到从淋巴组织提取的 RNA，并发现它能传递抗体专一性，因此称为信息 RNA（Informational RNA，简称 iRNA）。早期文献里提到的免疫 RNA 实际上是把含义不同的两类免疫活性物质——RNA-抗原复合物和信息 RNA（后来证明即为 mRNA）——混淆在一起了。

(一) 巨噬细胞的 RNA-抗原复合物和 iRNA

巨噬细胞在对许多种(不是全部)抗原的免疫反应中起着重要作用。但是到底如何起作用，还是一个争论未决的问题。最可能的机制是巨噬细胞能起集中抗原的作用，把基本上未改变的大分子抗原汇集在细胞表面，提供淋巴球和抗原之间有效地相互作用的机会(参看第十三章，401页)。另一种可能的机制是巨噬细胞能"加工"抗原，形成一种代谢上稳定的 RNA-抗原(或抗原片段)复合物，传递给淋巴细胞，引起专一的抗体反应。当然，这两种机制并不是互相排斥的。

这方面最早的证据是发现从腹腔渗出液细胞(主要是巨噬细胞)中提取的富含 RNA 部分能传递抗体专一性。已知对 T2 噬菌体的免疫反应需要巨噬细胞参加。Fishman (1961) 最先发现，T2噬菌体和巨噬细胞一起保温后得到的细胞裂解液能诱导淋巴结细胞产生专一的抗 T2 抗体。如果把和 T2 噬菌体保温过的巨噬细胞的 RNA 分离出来，这种富含 RNA 的制品也能诱导淋巴细胞产生专一的抗体（Fishman 和 Adler，1963)。虽然最初曾经设想 RNA 是专一地传递免疫信息的有效分子，后来发现这些 RNA 样品中总含有抗原片段，于是就使问题模糊起来了。进一步的分析才发现和抗原作用过的巨噬细胞的 RNA 产物，实际上包含着两类免疫活性物质，RNA-抗原复合物和 i-RNA，它们可被 BSA-硅藻土柱分离开来，前者位于峰 III (23S)，后者位于峰 II (～10—12S) (Fishman 和 Adler，1967)。RNA-抗原复合物和 iRNA 在性质上还存在其他方面的区别。首先，iRNA 本身的形成依赖对放线菌素 D 敏感的系统。巨噬细胞和抗原接触前，先加放线菌素 D 便能抑制 iRNA 的产生，但并不能抑制 RNA-抗原复合物形成。其次，诱导 iRNA 只需要很少量的抗原 (1 噬菌体颗粒 /1000 巨噬细胞)，而产生有效量的 RNA-抗原复合物，则需要相当大量的抗原 (100 噬菌体颗粒 /1000 巨噬细胞)。尤其重要的，RNA-抗原复合物所作用的靶细胞是具有对该抗原的专一受体的淋巴球。当用抗原亲合吸附法去除这些具有专一抗原受体的细胞后，剩余下来的淋巴球仍然能以同样的程度和 iRNA 起反应。总之，这些实验说明 RNA-抗原复合物和 iRNA 的产生和对靶细胞的作用方式都是不同的。并且，还有证据提示它们是腹腔渗出液细胞中不同的细胞群产生的（Fishman 和 Adler，1976)。实际上，它们是在来源、产生和作用方式上都不相同的两类免疫活性物质。RNA-抗原复合物在代谢上很稳定，免疫原性增强 20—200 倍，因而可能起着所谓"超抗原"("Super-Antigin") 的作用 (Goodman，1972；Gottlieb 和 Schwartz，1972)。另一方面，iRNA 则可能把专一的免疫信息传递到原来缺少专一的抗原受体的淋巴细胞，起扩大"定型细胞"数量的作用。不过，应当指出要严格地证明 iRNA 中绝对没有丝毫的抗原夹杂，仍然是非常困难的。

Fishman 实验室曾企图使用一种含砷的抗原（ARS-NAT）来解决这一难题。他们用原子吸收光谱法证明 iRNA 中 ARS-NAT 抗原含量<0.0000065%时，仍然能将产生抗 ARS-NAT 免疫反应的能力传递给适当的细胞（Schlagen 等，1974）。但是，应当注意到，在这种 RNA 制品中并不是所有的分子都是 ARS-NAT 抗原专一的 iRNA，很可能其中只有少数 RNA 分子才是抗原专一的。因此，据推算即使残存的极其微量的 ARS-NAT 抗原仍然可能以近乎 1:1 比例和专一的 iRNA 结合（Crouch，1976）。由此可见，要用这种方法来证明 iRNA 中绝对没有抗原夹杂是极其困难的（Adler，1972）。

（二）证明 iRNA 之信使RNA 功能的实验

对免疫 RNA 概念的最有力的支持是基于带有遗传标记的免疫专一性传递实验。用羊红血球免疫轻链的遗传标记为纯合子（b^4或 b^5）的家兔，从其淋巴结或腹腔渗出液细胞提取出 RNA，处理另一种遗传标记为纯合子的家兔的正常淋巴球，或体内注射，结果产生的抗体一部分表现出原来的抗原结合专一性，并且具有和施主轻链相同的遗传标记（Bell 和 Dray，1969；1972）。也就是说，从 A 同种异型动物的淋巴组织提取的 iRNA 能使 B 同种异型的淋巴细胞产生 A 同种异型的抗体。该文作者认为既然很难设想 iRNA 中夹杂的抗原本身能诱发细胞表现另一种遗传标记，更为可能的解释是 iRNA 能专一地传递免疫信息(包括同种异型和抗原结合专一性)，也就是说，iRNA 很可能起免疫球蛋白的信使 RNA 的作用。不过，也有人对此解释提出异议，认为这一实验结果可能是由于控制同种异型的调节基因表达异常引起的。因为曾经有人观察到基因型为（a^1a^3 /b^4b^5）的家兔在一定的免疫条件下，产生的抗体呈现原寄主动物从未有过的遗传标记(a^2b^6)（参看第十五章 479 页）。

过后不久，利用从髓细胞瘤提取的 RNA 进行的实验，证明了所谓 iRNA 很可能就相当于免疫球蛋白的 mRNA。从髓细胞瘤提取的 iRNA 能使正常淋巴细胞产生和施主细胞有相同的个体型专一性的免疫球蛋白（Bhoopalam 等，1972；Giacomoni 等，1974）。并且，这种 iRNA 对细胞的转化作用能被亚胺环己酮和嘌呤霉素等蛋白合成抑制剂抑制，而不被放线菌素 D 或利福平抑制。同时，这种 iRNA 的一般理化特性[如能和寡聚(dT)-纤维素结合，沉降行为等]也和 mRNA 相似。最重要的证据是，从被 T2 噬菌体免疫的家兔腹腔液渗出细胞提取的 iRNA，在小鼠 L 细胞无细胞蛋白合成系统中，能合成专一地中和 T2 噬菌体的 IgM 抗体，并带有和施主相同的遗传标记（Bilello 等，1975；1976）。这一实验事实显然很难用调节基因异常表现来解释。总之，所有这些事实都证明 iRNA 相当于 mRNA，并含有合成专一的 IgM 抗体所需的全部信息。此外，利用放射性同位素标记的 iRNA 处理离体培养的淋巴细胞，还证明 iRNA诱导抗体合成前，确实能进入细胞。并且，iRNA 对细胞的参入量比对照 RNA（从未免疫动物提取的）要高两倍，10^6脾脏细胞内有 6×10^6道尔顿 RNA 参入（Slomski 和 Latos，1977；Wang 等，1973）。

已知髓细胞瘤动物的淋巴球具有特殊的表面免疫球蛋白，并且对抗原的反应能力大大减低——即处于免疫抑制状态。从一种髓细胞瘤（LPC-1）提取的 iRNA 能将这种免疫抑制状态转移到正常动物；反之，iRNA 也可使处于免疫抑制状态的细胞逆转（Ya-

kulis 等，1973；Bhoopalam 等，1976a,b)。这些结果支持这样的假说，髓细胞瘤的免疫抑制状态可能是由于瘤细胞释放到血浆中的 iRNA 使其他正常 B 淋巴球表面特性发生转化的结果。实际上，在髓细胞瘤动物的血浆内，曾发现一些颗粒，能把正常淋巴球转化为具有和瘤细胞相同的表面免疫球蛋白特性的细胞（Katzman 等，1975）。

进一步的实验分析发现 iRNA 诱导淋巴细胞的转化不受放线菌素 D 抑制，但能被蛋白合成抑制剂抑制。同时，有证据提示细胞的这种转化是长期的和稳定的，并可能依赖于 iRNA 本身在受体细胞内的扩增。Bhoopalam 等（1976a）把从髓细胞瘤提取的RNA 注射到正常的小鼠。隔 12 小时后，取出脾脏，切下一半立即提取 iRNA，另一半继续培养 7 天后，再提取 iRNA。结果发现从培养 7 天脾脏细胞提取的 iRNA 比立即提取的 iRNA 对正常淋巴细胞的转化能力要大。此外，还用同样的步序提取 iRNA，连续传递五代，即每次把从脾脏提取的 iRNA 注射到另一正常小鼠，再从此小鼠脾脏提取 iRNA 继续注射到另一支正常小鼠，如此连续传五代。结果发现立即从脾脏提取的 iRNA 传二代或三代后，对细胞的转化能力就消失了，而从体外培养 7 天细胞提取的 iRNA，即使经过五代传递，仍然能保持转化细胞的活力。在这一实验以前，Satonori 等（1972）也观察到 iRNA 能连续几代传递免疫专一性的现象。总之，这些结果提示 iRNA 对淋巴细胞的转化作用是稳定的和长期的，并且 iRNA 在受体细胞内可能扩增，虽然其机制还不清楚。

最后，需要特别说明的，以上讨论的都是在实验条件下或病理条件下的情况。至于在正常免疫系统中，iRNA 是否也和免疫信息的传递、放大和记忆有关系，目前还不清楚。不过应注意，在实验条件下证明 iRNA 能专一地传递免疫信息，并不能据此推论在正常免疫诱导机制中也有细胞之间的 iRNA 传递参与作用。

（三）iRNA 传递细胞免疫性及应用于肿瘤免疫治疗的探讨

用从免疫动物淋巴结提取的 iRNA 处理未免疫动物的淋巴球时，还能把细胞免疫性（如巨噬细胞迁移抑制因子释放，迟发型皮肤过敏反应等）专一地传递给这些细胞（Thor，1967；Vyas，1974）。对照实验表明，单是抗原或从未免疫动物淋巴结提取的 RNA 都不能使正常淋巴球在离体条件下转化为致敏的细胞。后来，还发现 iRNA 能在异种之间传递细胞免疫性，如从 BCG 致敏的小牛的淋巴结提取的 iRNA 能将 BCG 过敏性传递至豚鼠（Wang 等，1974）。猕猴的 iRNA 能将对 KLH，PPD 的过敏性传递到人（Paque 和 Dray，1972）。已知 Hodgkin 氏病(淋巴网状细胞瘤)病人缺乏细胞免疫能力。从对 PPD 过敏病人淋巴球提取的 iRNA 能将对 PPD 的迟发型皮肤反应传递到这种肿瘤病人（Han，1973；Han 等，1975）。这一事实清楚地证明在人类，iRNA 同样能专一地传递细胞免疫性。

肿瘤免疫主要是细胞免疫。因此，理论上存在着利用 iRNA 专一地传递细胞免疫性，来进行肿瘤免疫治疗的可能性。

如第四章所述，有人在同基因型动物之间作肿瘤移植实验，发现无论化学或病毒诱发的肿瘤都有肿瘤专一的移植抗原存在；并且每一种化学诱发的肿瘤的移植抗原是瘤株专一的，即甚至用同一种致癌物质在同一品系的不同个体诱发的两株肉瘤细胞之间也没

有交叉反应(参看第四章，146 页)。Alexander (1966，1968) 就利用大鼠的这类移植肿瘤作材料。他先将肿瘤切下一部分去免疫同种或异种动物(羊)。免疫 5—10 天后，从胸导管取淋巴球，静脉注射到原来的施主，或移植过同一株瘤细胞的同基因型的大鼠体内，结果发现都能显著地抑制肿瘤的生长。后来，他们又用从这种淋巴球提取的 RNA (含有蛋白质)，足掌注射到大鼠，同样可刺激该动物的淋巴球专一地抑制这种肿瘤的生长。但是，较纯的 RNA 制品似乎反而无效。

继之，Pilch 实验室进行了一系列的工作 (Ramming 和 Pilch 1970，1971；Pilch 和 Ramming，1970；Deckers 和 Pilch，1971)。他们用苯吡在 C_3H 小鼠诱发的肉瘤(BP-4) 免疫 Hartley 纯系豚鼠。免疫 10—14 天后，从豚鼠脾脏、淋巴结提取 iRNA，并用这种 iRNA 来处理同基因型的 C_3H 小鼠的正常脾脏细胞。然后再把这些细胞注射到带瘤的 C_3H 小鼠腹腔内，便能专一地抑制 BP-4 移植肉瘤的生长。iRNA 传递的抑制作用是瘤株专一的。从 BP-1 肉瘤提取的 iRNA 只能抑制 BP-1 移植瘤，而不能抑制 BP-4 移植瘤的生长。

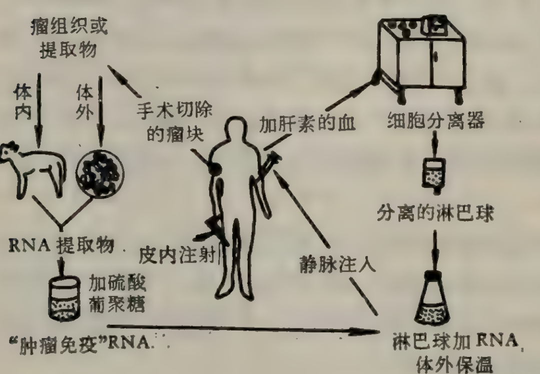


图 14-27　用异种"免疫" RNA 对人肿瘤作免疫治疗的模式图(据 Deckers 和 Pilch，1971)。

根据这一类动物实验结果，Pilch 提出一个将 iRNA 用于人类肿瘤免疫治疗的方案 (图 14-27) (Deckers 和 Pilch，1971)。肿瘤病人体内注射 iRNA 或静脉注射经过 iRNA 处理过的自身淋巴球，作为一个手术治疗后的"扫尾"治疗辅助手段，以防止残留的癌细胞的复发，或许是有价值的。由于问题的复杂性，iRNA 用于临床肿瘤治疗的结果，还存在许多疑问和争论的意见。这方面的初步试探结果，可以参看 Fritze 等的综述 (Fritze 等，1976)。这里不再赘述了。

最后，还应提到 iRNA 传递细胞免疫的机制是否和传递体液免疫相似，目前还不清楚。这里需要考虑一个和转移因子的关系问题。后者能传递细胞免疫，但不能传递体液免疫。目前，发现转移因子是一种低分子量物质(<5000 道尔顿)，并可能是低聚核糖核苷酸和多肽的复合物。

参　考　资　料

专著

Kabat, E. A. (1976). Structural basis of immunology and immunochemistry. 2nd ed. Chapter 11, N. Y. Holt. Rinehart and Winston.

Möller, G., ed. (1973). Lymphocyte immunoglobulin: synthesis and surface representatation. Transpl. Rev. Vol. 14.

Nezlin, R. S. (1972). Structure and Biosynthesis of Antibodies (in Russian). Chapter 5. Publishing house "NAUKA". Moskow.

Weiss, L. (1972). The cell and tissues of the immune system: structure. functions, interactions, Englewood Cliffs, Prontice Hall.

论文

Adler, F. L. (1972). Meeting report. RNA in the immune response. *Cellular Immunol.* **5**, 363.

Alexander. P. (1968). Immunotherapy of experimental tumours. In: "Progress in experimental tumour research", V. 10, Homburger. F. ed., Basel, S. Karger.

Alexander, P. (1968b). Stimulation of anti-tumour activity of the host with RNA from immune lymphocytes. In: "Nucleic acids in immunology". p. 527.

Aexander, P. Delorme, E. J., and Hall. J. G. (1966). The effect of lymphoid cells from lymph of specifically immunized sheep on the growth primary sarcomata in rats. *Lancet* **1**, 1186.

Askonas. B. A., and Williamson, A. R. (1967a). Balanced synthesis of light and heavy chains of IgG. *Nature* **216** 264.

Askonas. B. A. and Williamson, A. R. (1967b). Balanced heavy and light chain synthesis in immune tissue and disulfide bond formation in IgG assembly. In: "Gamma-globulins. Structure and control of biosynthesis", p. 369.

Askonas, B. A., Williamson. A. R., and Awdeh Z. L. (1969). Control of immunoglobulin formation. In: "Federation of European Biochemists Symposium", V. 15. p. 105.

Awdeh, Z. L., Williamson, and Askonas. B. A. (1970). One cell-one immunoglobulin. Origin of limited heterogeneity of myeloma proteins. *Biochem J.* **116**, 241.

Baumal, R. and Scharff, M. D. (1973). Synthesis, assembly and secretion of mouse immunoglobulin *Transpl. Rev.* **14**, 163.

Baumal, R., Potter, M. and Scharff, M. D. (1971). Synthesis, assembly and secretion of gamma globulin by mouse myeloma cells. III. Assembly of the three subclasses of IgG. *J. Exp. Med.* **134**. 1316.

Bell. C. and Dray, S. (1972). Conversion of homozygous lymphoid cells to produce IgM antibodies and IgG immunoglobulins of allelic light-chain allotype by injection of rabbits with RNA extracts. *Cellular Immunol.* **5**, 52.

Bell, C. and Dray. S. (1969). Conversion of non-immune spleen cells by ribonucleic acid of lymphoid cells from an immunized rabbit to produce γM antibody of foreign light chain allotype. *J. Immunol.* **103**, 1196.

Bhoopalam. N., Yakulis. V., Vosta, N. and Heller P. (1972). Surface immunoglobulin of circulating lymphocytes in mouse plasmacytoma. II. The influence of plasmacytoma RNA on surface immunoglobulin of lymphocytes. *Blood* **39**, 465.

Bhoopalam. N., Yakulis, V., Giacomoni, D. and Heller, P. (1976a). Surface immunoglobulins of lymphocytes in plasmacytoma. IV. Evidence for the persistence of the effect of plasmacytoma RNA on the surface Igs of normal lymphocytes in vivo and in vitro. *Clin. exp. Immunol.* **23** 139.

Bhoopalam, N., Chen, Y., Yakulis, V. and Heller, P. (1976b). Surface immunoglobulins of lymphocytes on plasmacytoma. V. The effect of RNA-rich extracts from mouse plasmacytoma MOPC104E on the immune response. *Clin. Exp. Immunol.* **24**, 357.

Bilello, P. A. Koch, J. and Fishman, M. (1975). mRNA activity of immunogenic RNA. *Fed. Proc.* **34**, 1030.

Bilello, P., Fishman, M. and Koch, G. (1976). Evidence that immune RNA is messenger RNA. *Cell. Immunol.* **23**, 309.

Brack. and Tonegawa, (1971). Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene for a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **74**. 5652.

Brownlee, G. G., Harrison. T. M., Mathews. M B. and Millstein, C. (1972). Translation of messenger RNA for immunoglobulin light chains in a cell-free system from Krebs II ascites cells. *FEBS Lett.* **23**, 244.

Choi, Y. S., Knoff. P. M. and Lennox. E. S. (1971). Intracellular transport and secretion of an immunoglobulin light chain. *Biochemistry* **10**, 669.

Collins, J. J., Black, P. H., Strosberg, A. D., Haber, E. and Bloch, K. J. (1974). Transformation by simian virus 40 of spleen cells from a hyperimmune rabbit: evidence for synthesis of immunoglobulin by the transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 260.

Cooper, M. (1976). B lymphocyte differentiation. In: "The Immune System", Chap. 13, p.

Crouch. R. J. (1976). An introduction to immune RNA. In: "Immune RNA in Neoplasia". P.X.V., M A. Fink ed., Academic press.

Cotton, R. G. H. and Milstein, C. (1973). Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells.

Nature **244**, 42.

Cowan, N. J. and Milstein, C. (1972). Automatic monitoring of biochemical parameters in tissue culture. Studies on synchronously growing mouse myeloma cells. *Biochem. J.* **128**, 445.

De Petris (1970). Electron microscopy of polyribosomes synthesizing immunoglobulin chains. *Biochem. J.* **118**, 385.

Deckers, P. J. and Pilch, Y. H. (1971). RNA-mediated transfer of tumor immunity: A new model for the immunotherapy of cancer. *Cancer* **28**, 1219.

Dintzis, H. M. (1961). Assembly of the peptide chains of hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **47**, 247.

Fishman, M. (1961). Antibody formation in vitro. *J. Exp. Med.* **114**, 837.

Fishman, M. and Adler, F. L. (1963). Antibody formation initiated in vitro. II. Antibody synthesis in X-irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic acid derived from macrophages incubated with antigen. *J. Exp. Med.* **117**, 595.

Fishman, M. and Adler, F. L. (1967). The role of macrophage-RNA in the immune response. *Cold Spring Habor Symp. on Quant. Biol.* **32**, 343.

Fishman, M. and Adler, F. L. (1976). Current status of immune RNA. In: "Immune RNA in Neoplasia", p. 53, M. A. Fink ed.

Fleischman, J. B. (1967). Synthesis of the G heavy chain in rabbit lymph node cells. *Biochemistry* **6**, 1311.

Frangione, B. and Milstein, C. (1969). Partial deletion in the heavy chain disease protein ZUC. *Nature* **224**, 597.

Fritze, D., Kern, D. H. and Pilch, Y. H. (1976). Transfer of tumor specific immunity with "immune RNA": Prospects for the treatment of human cancer. *Klin. Wochenschrift*, **54**, 851.

Garvey, J. S. and Campbell, D. H. (1956). Studies of the retention and properties of ^{35}S labeled antigen in livers of immunized rabbits. *J. Immunol.* **76**, 36.

Giacomoni, D., Yakulis, V., Wang, S. R., Cook, A., Dray, S. and Heller, P. (1974). In vitro conversion of normal mouse lymphocytes by plasmacytoma RNA to express idiotypic specificities on their surface characteristics of the plasmacytoma immunoglobulin. *Cell. Immunol.* **11**, 389.

Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces. *Nature* **271**, 501.

Gilmore-Herbert, M. and Wall, R. (1978). Immunoglobulin light chain mRNA is processed from large nuclear RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **75**, 342.

Goodman, J. W. (1972). The transfer of immunity with macrophage RNA. Contemporary topics in immunochem., V. **1**, p. 93.

Gottlieb, A. A. and Schwartz, R. H. (1972). Antigen-RNA interactions. *Cell. Immunol.* **5** 341.

Gurdon, J. B. (1974). Molecular biology in a living cell. *Nature.* **248**, 772.

Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland H. R. and Marbaix, J. (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells, *Nature* **233**, 177.

Han, T. (1973). "Immune-RNA" mediated transfer of delayed skin reactivity in patients with Hodgkins disease. *Clin. Exp. Immunol.* **14**, 213.

Han, T., Pauly, J. L. and Mittloman, A. (1975). Adoptive transfer of cellmediated immunity to tuberculin using RNA from tuberculin sensitive subjects. *Immunol.* **28**, 127.

Huez, G., Marbaix, G., Gallwitz, D. Weinberg, E., Devos, R., Hubert, E., and Cleuter, Y. (1978). Functional stabilization of HeLa cell histone messenger RNAs injected into Xenopus oocytes by 3-OH polyadenylation. *Nature* **271**, 572.

Katzmann, J., Giacomoni, D., Yakulis, V. and Heller, P. (1975). Characterization of two plasmacytoma fractions and their RNA capable of changing lymphocyte surface immunoglobulins (cell conversion). *Cell. Immunol.* **18**, 98.

Klevecz, R. R. (1969). Temporal coodination of DNA replication with enzyme synthesis in diploid and heteroploid cells. *Science* **166**, 1536.

Köhler G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495.

Koprowski, H., Steplewski, Z., Herlyn, D. and Herlyn, M. (1978). Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **75**, 3405.

Kuechler, E. and Rich, A. (1969). Sequential synthesis of m-RNA and antibodies in rabbit lymph nodes. *Nature* **222**, 544.

Janossy, G., Greaves, M. (1975). Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets. *Transp. Rev.* **24**, 176.

Jerne, N. K. Nordin, A. A., and Henry, C. (1963). The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. In: "Cell-bound antibodies", ed. B. Amos and H. Koprowski, p. 109.
Lawton, A. R. and Cooper, M. (1974). Modification of B lymphocyte differentiation by anti-immunoglobulins. In: "Contemp. Topics in Immunobiology", V. 3, p. 139.
Lennox, E. S., Knopf, P. M., Munro, A. J. and Parkhouse, R. M. E. (1967). A search biosynthesis subunits of light and heavy chains of immunoglobulins. Cold Spring Harbor Sympos. 32, 249.
Mach, B., Faust C. and Vassalli, P. (1973). Purification of 14S mRNA of light chain that codes for a possible light chain precursor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 451.
Marx, J. L. (1978). Gene structure: more surprising developments. *Science* **199**, 517.
Melchers, F. (1970). Biosynthesis of the carbohydrate portion of immunoglobulins. Kinetics of synthesis and secretion of [^{3}H] leucine, [^{3}H] galactose and [^{3}H] mannose-labelled myeloma protein by two plasma cell tumours. *Biochem. J.* **119**, 765.
Melchers, F. (1971). Biosynthesis, transport and secretion of immunoglobulin in plasma cells. *Histochem. J.* **3**, 389.
Melchers, F. (1973). Synthesis, transport and secretion of immunoglobulins in lymphoid cells. In: "The biochemistry of gene expression in higher organisms" ed. by J. K. Pollak, p. 542.
Milstein, C., Brownlee, G. G., Harrison, T. M. and Mathew, M. B. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biology*. **239**, 117.
Mohit, B. (1971). Immunoglobulin G and free kappa-chain synthesis in different clones of a hybrid cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (*U. S. A.*) **68**, 3045.
Mushinski, J. F. (1971). A half molecules: defective heavy chain mutants in mouse myeloma proteins. *J. Immunol.* **106**. 41.
Owen, J. J. T., Cooper, M. D. and Raff, M. C. (1974). In vitro generation of B lymphocytes in mouse foetal liver—a mammalian "bursa equivalent". *Nature* **249**, 361.
Paque, R. E. and Dray, S. (1972). Monkey to human transfer of delayed hypersensitivity in vitro with RNA extracts. *Cell. Immunol.* 5, 30.
Parkhouse, R. M. E. and Melchers F. (1971). Biosynthsis of the carbohydrate portions of immunoglobulin M. *Biochem. J.* **125**, 1235.
Parkhouse, R. M. E. (1973). Assembly and secretion of immunoglobulin M (IgM) by plasma cells and lymphocytes. *Transplant. Rev.* **14**, 131.
Parkhouse, R. M E. (1974). Biosynthesis of polymeric immunoglobulins. In: "Progr. Immunol. II., V. l'Immunochem. Asp." p. 119.
Periman, P. (1970). IgG synthesis in hybrid cells from an antibody producing mouse myeloma and an L cell substrain. *Nature* **228**, 1086.
Pernis, B., Formi, L. and Amante, L. (1971). Immunoglobulins as cell receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **190**, 420.
Pilch, Y. H. and Ramming, K. P. (1970). Transfer of tumor immunity with RNA. *Cancer* **26**, 630.
Potter, M. (1972). Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol. Rev.* **52**, 631.
Ramming, K. P. and Pilch, Y. H. (1970). Mediation of immunity to tumor isografts in mice heterologous ribonucleic acid. *Science* **168** 492.
Ramming, K. P. and Pilch Y. H. (1971). Transfer, of tumor-specific immunity with RNA: inhibition of growth of murine tumor isografts. *J. Int. Cancer Inst.* **46**, 735.
Rowe, D. S., Hug, K., Forni, L. and Pernis, B. (1973). Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. *J. Exp. Med.* **138**, 965.
Satonori, K. and Mitsuhashi, S. (1972). Serial passive transfer of immune reponse by an immune RNA preparation. *J. Immunol.* **108**, 1034.
Shapiro, A. L., Scharff, M. D., Maizel, J. V. and Uhr, J. W. (1966). Polyribosomal synthesis and assembly of the H and L chains of gammaglobulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **56** 216.
Scharff, M. D. and Laskov, R. (1970). Synthesis and assembly of immunoglobulin polypeptide chains *Progr. Allergy*. 14, 37.
Schlager, S. I., Dray, S., and Paque, R. E. (1974) Atomic spectroscopic evidence for the absence of a low-molecular weight (486) antigen in RNA extracts shown to transfer delayed-type hypersensitivity in vitro. *Cell. Immunol.* **14**: 104.
Schechter, J. (1973) Biologically and chemically pure m-RNA coding for a mouse immunoglobulin L-chain prepared with the aid of antibodies and immobilized oligothymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci* (U. S. A.) **70**, 2256.

Schechter, J. and Burstein, Y. (1976). Marked hydrophobicity of the NH_2-terminal extra piece of immunoglobulin light chain precursors: possible physiological functions of the extra piece. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **73**, 3273.

Schubert, D. (1968). Immunoglobulin assembly in a mouse myeloma. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **60**, 683.

Schwaber, J. and Cohen, E. P. (1974). Patterns of immunoglobulin synthesis and assembly in a human-mouse somatic cell hybride clone. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 2203.

Seligman, M., et al. (1969). Immunochemical studies in four cases of alpha chain disease. *J. Clin. Invest* **48**, 2374.

Shapiro, A. L., Scharff, M. D., Maizel, J. V. and Uhr, J. W. (1966). Polyribosomal synthesis and assembly of the H and L chains of gamma-globulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **56** 216.

Sherr, C. J. and Uhr, J. W. (1969). Immunoglobulin synthesis and secretion. III. Incorporation of glucosamine into Ig on polyribosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **64**, 381.

Sherr, C. J. and Uhr, J. W. (1970). Immunoglobulin synthesis and secretion. V. Incorporation of leucine and glucosamine into immunoglobulin on free and bound polyribosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **66**, 1183.

Slomski R. and Latos, A. M. (1977). Studies of interaction of immune RNA with normal spleen cells *Mol. Cell. Biochem.* **17**, 85.

Smith, M. M. and Huang, R. C. C. (1976). Transcription in vitro of immunoglobulin kappa light chain genes in isolated mouse myeloma nuclei and chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **73**, 775.

Solomen, A. and McLaughlin, C. L. (1970). Biosynthesis of low molecular weight (7S) and high molecular weight (19S) immunoglobulin M. *J. Clin. Invest.* **49**, 150.

Spiegelberg, H. L., Abel, C. A., Fishkin, B. G. and Grey, H. M. (1970). Localization of the carbohydrate within the variable region of light and heavy chains of human G myeloma proteins. *Biochemistry* **9**, 4217.

Stavnezer, J. and Huang, R. C. C. (1971). Synthesis of a mouse immunoglobulin light chain in a rabbit reticulocyte cell-free system. *Nature New Biol.* **230**, 172.

Stevens, R. H. and Williamson, A. R. (1972). Specific IgG mRNA molecules from myeloma cells in heterogeneous nuclear and cytoplasmic RNA containing poly A. *Nature* **239** 143.

Stevens, R. and Williamson, A. (1973a) Isolation of messenger RNA coding for mouse heavy-chain of immunoglobulin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 1127.

Stevens, R. H. and Williamson, A. R. (1973b). Isolation of nuclear pre-mRNA which codes for immunoglobulin heavy chain. *Nature new Biol.* **245**, 101.

Stevens, R. H. and Williamson, A. R. (1973c). Translational control of immunoglobulin synthesis. I Repression of heavy chain synthesis. *J. Mol. Biol.* **78**, 505; II. Cell free interaction of myeloma Ig with mRNA. *J. Mol. Biol.* **78** 517.

Stevens, R. H. and Williamson, A. R. (1974). mRNA for H and L chains of immunoglobulin: specific control. of H-chain production. In: "Contemp. Topics in Mol. Immunol.", V. 3, p. 85.

Strosberg, A. D., Collins, J. J., Black, P. H., Malamud, D. M., Wilbert, S., Bloch, K. J. and Haber, E (1974). Transformation by simian virus 40 of spleen cells from a hyperimmune rabbit: Demonstration of production of specific antibody to one immunizing antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 263.

Terry, W. D. and Ohms J. (1970). Implications of heavy chain disease protein sequences for multiple gene theories of immunoglobulin synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **66**, 558.

Thor, D. E. (1976). Delayed hypersensitivity in man: a correlate in vitro and transfer by an RNA extract. *Science* **157**, 1567.

Vyas, G. N., Ibrahim, A. B., Rao, K. R., and Likhit, V. (1974). In vitro transfer of cell-mediated immunity to hepatitis B antigen. *Nature* **247**, 377.

Wabl. M. R., Forni, L., Loor, F. (1978). Switch in immunoglobulin class production observed in single clones of committed lymphocytes. *Science* **200**, 1078.

Wang, A. C., Wilson, S. K., Hopper, J. E. and Fudenberg, H. H. (1970). Evidence for control of synthesis of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **66**, 337.

Wang, S. R., Giacomoni, D. and Dray, S. (1973). Physical and chemical characterization of RNA incorporated by rabbit spleen cells. *Exp. Cell Res.* **78**, 15

Wang, B. S., Stuart, P. A. and Mannick, J. A. (1974). Interspecies transfer by "immune" RNA of lymphocyte proliferative response to specific antigen. *Cell. Immunol.* **12**, 114.

Warner, N. L. and Harris A W (1973). Immunoglobulin gene expression in murine lymphoid cells. In: "The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms", p. 612.

Williamson, A. R. (1971). Biosynthesis of antibodies. *Nature* **231**, 359.

Williamson, A. R. (1973). Biosynthesis of immunoglobulins. In: "Defence and Recognition" MIT Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. 1, V. 10, p. 230.

Williamson, A. R., and Askonas, B. A. (1968). Time course of labelling of light and heavy chains of IgG and the turnover of the free light chain intermediates. *Arch. Biochem. and Biophy.* **125**, 21.

Yakulis, V., Cabana, V., Giacomoni, D. and Heller, P. (1973). Surface immunoglobulin of circulating lymphocytes in mouse plasmacytoma. III. The effect of plasmacytoma RNA on the immune response. Immunol. Commun. 2, 129.

Zagury, D., Uhr, J. W., Jamiesen, J. D. and Palade, G. E. (1970). Immunoglobulin synthesis and secretion. II. Radioautographic studies of sites of addition of carbohydrate moieties and intracellular transport. *J. Cell. Biol.* **46**, 52.

Zurawski, V. R., Haber, E. and Black, P. H. (1978). Production of antibody to tetanus toxoid by continuous human lymphoblastoid cell lines. *Science* **199**, 1439.

第十五章　免疫球蛋白和免疫反应的遗传控制

鉴定免疫球蛋白和免疫反应的基因，并研究其控制影响是阐明免疫学现象的分子基础的重要途径。免疫球蛋白重链和轻链 C 区和 V 区遗传标记(同种异型抗原决定簇)的发现，使有可能对免疫球蛋白肽链的结构基因进行遗传分析。这方面研究证明免疫球蛋白肽链合成是受位于常染色体上，彼此不连锁的三群基因(重链的，λ-轻链的和 κ 轻链的)编码的，而重链的类别和亚类又是由彼此紧密连锁的不同的结构基因决定的。重链和轻链的 V 区和 C 区分别由 V 基因、C 基因编码。两个基因决定一条多肽链，而不是一个基因决定一条多肽链。这是免疫球蛋白肽链合成的遗传控制的一个突出的特点。

当前免疫学的一个根本问题是抗体多样性起源的遗传控制。免疫系统如何产生如此多种多样的抗体，以适应识别多种多样的抗原决定簇的需要，这显然要求特殊的遗传机制。目前假定一个相同的 C 基因可能和许多不同的 V 基因结合，从而决定抗原结合位点易变区结构的多样性。然而，V 基因存在多少变异形式？这些众多的变异形式是在进化过程中起源，并通过生殖细胞传递下来的，还是在个体发育过程中通过体细胞突变发生的？不同的 V 基因如何与 C 基因连接起来，共同决定重链和轻链的结构？由于分子遗传学和遗传工程技术的进步，对这些问题的研究已从理论上的探讨进入到实验验证的阶段。随着免疫球蛋白肽链的 mRNA 和基因的分离、扩增的成功，目前已可能通过分子杂交来估计细胞内免疫球蛋白 V 基因的数目和排列方式，甚至直接分析 V 基因的构造。这方面可以期待近期内将有很大的进展。

免疫反应的诱导是一个十分复杂的过程。对于大多数抗原，抗体合成的诱导需要 T、B 两类淋巴球以及巨噬细胞的协同作用。这一复杂过程的每一步骤都可能是受基因控制的。近来，在纯系豚鼠和小鼠对特定抗原的免疫反应能力作遗传分析，证明这些免疫反应是受与主组织相容性基因座连锁的基因 (Ir 基因)控制的。Ir 基因座的性质和功能，其基因产物和 T 细胞抗原受体的关系，都是目前正在研究尚未完全解决的问题，本章只能作一些简略的叙述。

一、免疫球蛋白的遗传标记：同种异型和个体型

如前所述(见第六章，184 页)，免疫球蛋白抗原性的不均一性是由于其肽链结构受遗传控制的三重变异的结果。同一物种所有个体的免疫球蛋白共同具有的抗原专一性称为同族专一性。同一物种的不同个体间，存在几种形式的抗原专一性，即多型现象，称为同种异型专一性。每一个体的个别抗体(或髓细胞瘤蛋白质)具有的独特的抗原专一性称为个体型专一性。这三种抗原专一性分别位于免疫球蛋白肽链的不同部分(图 15-1)。

同种异型在遗传上是受位于常染色体上基因座的一组等位基因控制的。这些等位基因是共显性的，并按孟德尔方式遗传。这些位于免疫球蛋白多肽链不同位置上的抗原决

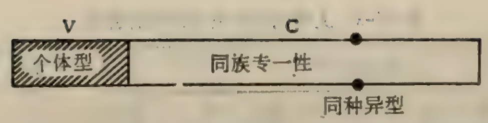


图 15-1 三种抗原专一性在人免疫球蛋白重链上的定位。同族专一性位于C区，是不同的结构基因的产物。同种异型是特定基因座的等位基因的产物，相当于C区或V区个别氨基酸残基的置换。个体型专一性位于V区，包含结合位点的抗原决定簇。

定簇，可以用血清学方法检测出来。因此，可以当作遗传标记，提供研究抗体构造的遗传控制的有力工具。实际上，关于免疫球蛋白遗传控制的现有知识（形式遗传、群体遗传、医学遗传和生化遗传等）大都是借助这些遗传标记的研究得到的。同种异型已在大多数哺乳类物种（包括人、猴、家兔、小鼠和大鼠等）发现，很可能在其他脊椎动物也存在。

（一） 人　类

Grubb（1956）研究低γ球蛋白血症病人血清中存在的抗免疫球蛋白抗体时，发现人的免疫球蛋白呈现同种异型现象。由此开始的广泛研究，发现人免疫球蛋白有三种同种异型标记，Gm，Am 和 Inv 系统。Gm 因子只存在于 IgG 的γ链上，Am 因子存在于 IgA_2 的 α_2 链上。Inv 因子存在于κ轻链上。λ轻链尚未发现同种异型标记。前两个基因系统在遗传上是紧密连锁的，而 Inv 系统则和二者不连锁。人类同种异型的检测方法通常是采用间接被动血凝反应（Coomb's test）（参看第十一章）（Grubb，1970）。

1. 命名

Gm 和 Inv 系统的命名在第六章已有过叙述。然而，有些原来认为是独立的因子，后来证明并非如此。例如，Gm(b^w)，Gm(b^2)，Gm(f) 可能是同一个因子；Gm(b)和Gm(b′) 也是这样。现将经世界卫生组织（WHO）专门会议修订后的命名系统列于表15-1。

2. 分子定位

（1）遗传标记和免疫球蛋白链及IgG亚类的关系

Gm 因子在 IgG 的四个亚类上都存在。但是，它们在各亚类上的分布是不平均的，特定的几个 Gm 因子分布在特定亚类的γ链上。例如，Gm(a)，(x)，(f)，(z) 位于γ1链上；Gm(b)，(c)，(s)，(t)，(g) 等位于γ3链上；Gm(n) 位于γ2链上（见表15-1，图15-2）。位于同一条肽链上的几个 Gm 因子，自然在遗传上总是相连在一起分离的。不过，需要指出的是，由于 Gm 因子在遗传上呈现多型现象，一定亚类的 IgG 分子只表现有关基因座之部分标记。例如，IgG_3（γ3 链）可能具有 Gm(b) 或 Gm(g)，而不能兼而有之；白种人和黑种人的 IgG_1（γ1 链）可能具有 Gm(a) 或 Gm(f)，而不能兼而有之（Natvig 等，1967）。同时，还需要介绍一个颇为费解的名词和概念。试举 IgG_1 亚类的 Gm(a) 同种异型标记为例。早期血清学研究发现 IgG_1 存在一对交替出现的抗原决定簇，所有 IgG_1 蛋白（γ1 链）或者是 Gm(a)，或者是 Gm(non-a)，而不能兼而

表 15-1 人类免疫球蛋白的同种异型

位 置	建议的符号		曾用符号	
	字 母	数 字		
H链				
$\gamma 1$	G1m(a)	G1m(1)	Gm(a)	Gm(1)
	(x)	(2)	(x)	(2)
	(f)	(3)	(bw),(b2),(f)	(3),(4)
	(z)	(17)	(z)	(17)
$\gamma 2$	G2m(n)	G2m(23)	(n)	(23)
$\gamma 3$	G3m(b0)	G3m(11)	(b^{β}),(b^{0})	(11)
	(b1)	(5)	(b),(b1)	(5)(12)
	(b3)	(13)	(b3),(Bet)	(13)(25)
	(b4)	(14)		
	(b5)	(10)	($b\alpha$),(b5)	(10)
	(c3)	(6)	(Gm-like),(c),(c3)	(6)
	(g)	(21)	(g)	(21)
	μ	(26)	Pa	
	ν	(27)	Ray	
	(s)	(15)	(s)	(15)
	(t)	(16)	(t)	(16)
$\alpha 2$	A2m(a)	A2m(1)	Am(1),Am^{+}	Am(2),Am^{-}
	A2m(2)	A2m(2)		
L链				
κ	Km(1)	Km(1)	Inv(1)	
	(2)	(2)	Inv(a),Inv(2)	
	(3)	(3)	Inv(b),Inv(3)	

(据 W.H.O., Rouen, 1974)。

表 15-2 人类 IgG 的"非等位"标记(isoallotypic marker).

位 置 (H 链)	建 议 的 符 号		曾 用 符 号
	字 母	数 字	
$\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$	Na	N1	non-a
$\gamma 3$	Nb0	N11	non-b0
$\gamma 3$	Nb1	N5	non-b1
$\gamma 3$	Ng	N21	non-g
$\gamma 1$, $\gamma 3$, $\gamma 4$(N4a)	N4a	N4a	4a, $\gamma 4$ non-a
$\gamma 2$, $\gamma 4$(N4b)	N4b	N4b	4b, $\gamma 4$ non-b

(据 Frangione, 1975)。

有之。因此,对于 $\gamma 1$ 链, Gm(a) 和 Gm(non-a) 是真正等位的抗原决定簇。可是,又发现所有 $\gamma 2$ 链和 $\gamma 3$ 链上也有 Gm(non-a), 但没有 Gm(a); 所有 $\gamma 4$ 链则既无 Gm(non-a), 亦无 Gm(a) (Natvig 等, 1969) (图 15-2)。因此, 在 IgG_1 ($\gamma 1$ 链), Gm(non-a)和Gm(a) 是等位的;在 IgG_2 ($\gamma 2$ 链)和 IgG_3 ($\gamma 3$ 链),虽然存在 Gm(non-a),但不是等位的;在 IgG_4($\gamma 4$ 链)则不存在。具有类似特性的抗原决定簇,在其他 IgG亚类也发现(表 15-2)。这些在一个亚类表现为等位的,而在另一个或几个亚类则不表现为等位的抗原决定簇,称为"非等位"标记("non" marker 或 Isoallotype)。

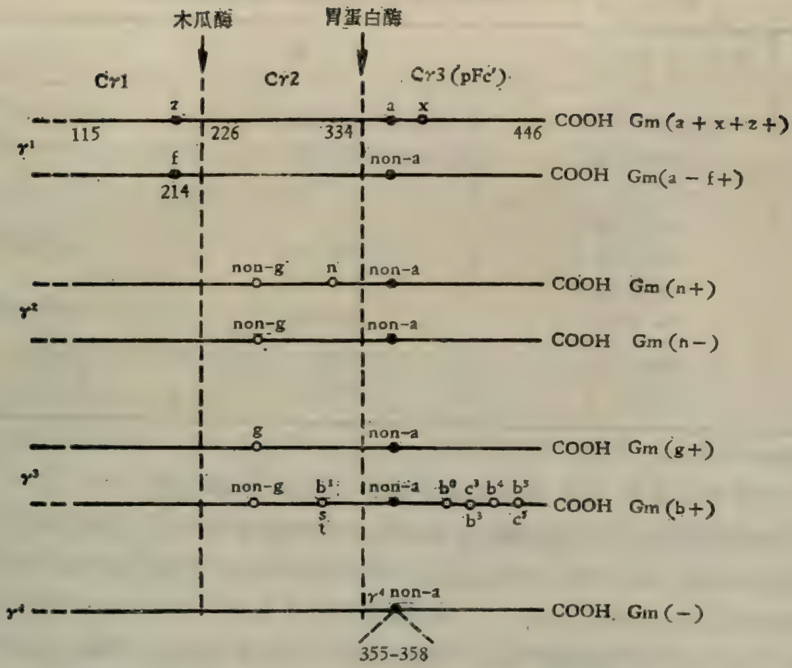


图 15-2 Gm-决定簇在人γ链各亚类上的位置。(○)决定簇位置尚未精确测定(据 Nisonoff 等，1971)。

Km (即 Inv) 因子位于κ型轻链上。由于κ型轻链可能参加所有各类免疫球蛋白的组成。因而 Km 决定簇在 IgG, IgM, IgA, IgD, 和 IgE 均可能出现。Km 抗原专一性是受三个等位基因 $Km^{1,2}$, Km^{1}, Km^{3} 控制的。

(2) 遗传标记和氨基酸置换的关系

理论上，同种异型标记(抗原决定簇)可归结于免疫球蛋白肽链的一级结构，糖残基或糖和多肽共同形成的特异的结构。对具不同 Km 专一性的κ轻链的一级结构的比较表明 Km (1,2) 和 Km(3) 抗原专一性在构造上的区别仅在于C 区 191 位置一个氨基酸残基的互换，Km(1,2) 为 Leu, Km(3) 为 Val。当出现罕见的 Km(1)时，153 位置的 Ala 被 Val 置换 (Milstein 和 Pink, 1970)。另一方面，已知许多轻链不含低聚糖。因此，也证明 Km 抗原决定簇和糖残基无关。

Gm 因子仅见于 IgG。 大多数位于γ链的不变区的 Fc 部分，少数 [Gm(f) 和 Gm(z)] 则位于 Fd 的 $C\gamma^1$。大多数或全部 Gm 抗原专一性同样只是和肽链的一级结构有关系。对不同 Gm 专一性的人 γ1 链的酶解肽段图谱的比较，发现当存在 Gm(a) 因子时，图谱上出现一个特异的肽段，Gm(a) 肽段；当存在 Gm(non-a) 因子时，则出现另一个特异的肽段，Gm(non-a) 肽段。这两个肽段均位于 Fc 中段的 356—360 位置。其顺序如下示：

	356 … 360
Gm(a) 肽段	Asp -Glu- Leu -Thr-Lys
Gm(non-a) 肽段	[Glu] -Glu- [Met] -Thr-Lys

从上面看出，和 Gm(a) 同种异型有关的是两个氨基酸残基的置换，而不是单个残基

表 15-3 人 IgG 各种同种异型抗原决定簇的位置和氨基酸差别

链	遗传标记	位　置	残基(顺序)
κ	Km(1)	153…191	Val…Leu
κ	Km(1,2)	153…191	Ala…Leu
κ	Km(3)	153…191	Ala…Val
γ1	Glm(z 或 17)	214	Lys
γ1	Glm(a 或 1)	356…358	Asp-Glu-Leu
γ1	Glm(f 或 3)	214	Arg
γ1	Na 或N1	356…358	Glu-Glu-met
γ4	N4a	309	Leu
γ4	N4b	309	缺失

(据 Frangione, 1975)。

的点突变。关于这一点在 IgG 分子进化上的意义，以后还要谈到。

和人 γ 链同种异型有关的氨基酸置换的现有资料见表 15-3。从表上可见，当 γ1 链的遗传标记为 Gm(f, Na) 时，214 位置为 Arg，356 和 358 位置分别为 Glu 和 Met；当分子的遗传标记为 Gm(a, z)时，214 位置则改变为 Lys，356 和 358 位置则分别改变为 Asp 和 Leu。当 γ3 链的遗传标记为Gm(b1) 时，436 位置为 Phe；而分子为 Gm(g) 时，同一位置则改为 Tyr。当 γ4 链的遗传标记为 N4a 时，309 位置是 Leu；而在 N4b 分子，同一位置的残基缺失。此外，还有证据表明同种异型决定簇的血清学活力依赖于免疫球蛋白分子的四级结构。例如，位于 Fd 片段上的 Gm 因子只有在完整的免疫球蛋白分子上才表现出来 (Polmar 和 Steinberg, 1964)。

关于 Am 因子有关的氨基酸置换细节，还不清楚。已知Am(1)阳性的 α_2 重链缺少重链和轻链间的二硫桥(参阅第八章 236 页)。这一事实提示原来 Am(-1) 重链上的一个半胱氨酸残基在 Am(1) 上可能被另一氨基酸残基置换，或者形成了重链间二硫桥。

3. 遗传

借助同种异型标记，对人类免疫球蛋白遗传分析的一个重要结果是证明了这些遗传标记是以两个独立的连锁群遗传的，重链连锁群(包含 Gm 和 Am 系统)和 κ 轻链连锁群 (Km 系统)。

(1) Km 系统(κ 轻链)

如上述，Km 系统包括 Km(1)，Km(1,2)，Km(3) 因子。家族和群体遗传分析证明这些因子是受 Km 基因座的三个等位基因 Km^1，$Km^{1,2}$，Km^3 控制的。这些等位基因是共显性的，在杂合子个体，两个等位基因的产物都可能表现出来。对不同遗传标记的 κ 链的一级结构分析证明，Km(1) 和 Km(2) 的差别仅在于153 位置一个氨基酸残基的交换。这说明 κ 轻链 C 区的遗传变异是和血红蛋白相似，通过单个点突变表现出来。

家族遗传分析证明，Km 基因座和 Gm 基因座相距很远(至少 30 交换单位)。因此，它们很可能位于不同的染色体上，或者同一染色体不同的两端上。

(2) Am 系统(α_2 重链)

Am 系统迄今只发现一个 Am 因子，位于 IgA_2 的 α_2 重链 C 区。家族和群体遗传分析证明 Am^1 和 Am^{-1} 是共显性的等位基因。对 13 个家族(包括 41 个子女)的连锁研究证明，Am 基因座和 Gm 基因是紧密连锁的。这一结论在家兔和小鼠上也得到证实。所有免疫球蛋白重链的 C 基因 (C_γ, C_α, C_μ…等) 都很可能位于同一条染色体上，并且是紧密连锁的。

(3) Gm 系统(γ 链)

家族和群体遗传研究同样证明 γ 链的四个亚类彼此之间，以及它们和 α_2 链之间是紧密连锁的 (Kunkel 等, 1969a)。同时，Gm 因子在 IgG 各亚类上的分布又是不平均的，特定的 Gm 因子位于特定亚类的 γ 链上。由于这两方面的原因，结果位于两条同型染色体之任一条上的一组共显性等位基因决定的几个 Gm 因子是成组地遗传的。这样一组遗传标记称为表型群 (Phenogroup 或 allogroup)。由于一个表型群是受位于同一条染色体上的等位基因决定的，因而也称为单元型 (Haplotype)。群体遗传研究发现 Gm 表型群在不同人种的分布存在明显的区别(表 15-4)。例如，在白种人 Gm(a), (z), (g) 是一个常见的表型群，也就是说在正常个体这些因子或者全呈阳性，或者全呈阴性。同样地，Gm(f), (b), (b^0), (b^3) 和 (b^4) 是另一个常见的表型群，正常个体或者为 Gm(f+, b+, b^0+, b^3+, b^4+)，或者为Gm(f−, b−, b^0−, b^3−, b^4−)。家族遗传研究还

表 15-4 不同人种内常见的 Gm 表型群

种族	表型群		
	IgG1	IgG3	IgG2
白种人 (Caucasian)	f	b, b^0, b^3, b^4	n
	f	b, b^0, b^3, b^4	—
	a,z	g	—
	a,x,z	g	—
黑种人 (Negroid)	a,z	b, b^0, b^3, b^4	—
	a,z	b, b^0, c^3, c^5	—
	a,z	b, c, b^0, b^4	—
	a,z	b^0, b^3, s	
黄种人 (Mongoloid)	a,z	b^0, b^3, s, t	—
	a,f	b, b^0, b^3, b^4	n
	a,x,z	g	—
虾夷人 (Ainu)	a,z	g	—
	a,z	b^3, s, t	—
	x,z	g	—
南非卡拉哈里人 (Bushmen)	a,z	g	—
	a,z	b	—
	a,z	b^3, s	—
	a,z	b, b^3, b^4	—
俾格米人 (Pygmy)	a,z	b, c^3, c^5	—
	a,z	b, b^3, b^4	—

(据 Fudenbug, 1972)。

证明一个基因型为 $Gm^{a,z,g,f,b,b^0,b^3,b^4}$ 的杂合子，其中 $Gm^{a,z,g}$ 基因来自亲代的一方，而 Gm^{f,b,b^0,b^3,b^4} 基因则来自另一方。另一方面，对个别髓细胞瘤蛋白的 Gm 标记的研究，表明 Gm(a)，(f)，(z) 专一性只限于 IgG_1 亚类；而 Gm(b)，(b^0)，(b^3)，(b^4)，(g) 则限于 IgG_3 亚类，即特定的 Gm 标记可能位于特定亚类的γ-链上。此外，在正常个体所有四个 IgG 亚类都同时存在，但含量有不同。所有以上这些资料提示，“Gm 基因座”可以进一步划分为几个基因座，它们各编码一个 IgG 亚类。换句话说，IgG 的三个亚类（IgG_1，IgG_2，IgG_3）各受一个基因座编码，而这些基因座又是紧密连锁的。至于 IgG_4 亚类是否呈现多型性，还不清楚（参看 Grubb，1970；Fudenberg，1972；Mage 等 1973）。

（4）IgG 结构基因的数目和次序

如上述，至少存在四个不同的γ链的结构基因（顺反子），各自编码 IgG 四个亚类。同样地，很可能存在两个 IgA 结构基因。至于 IgM，IgD，IgE 是否存在亚类还不清楚。据现有资料，估计各类免疫球蛋白重链 C 基因总数当不少于 9 个，或许不超过 12—15个。

IgG 四个亚类重链（γ1，γ2，γ3，γ4 链）的结构基因之间的重组频率非常低，表明它们是紧密连锁的。对丹麦两个家族非常罕见的表型群的研究，发现在一个家族中位于γ2 链上的 Gm(n) 和位于γ3 链上的 Gm(g) 可能发生交换；而在另一个家族，位于γ1 链上的 Gm(f) 和位于γ3 链上的 Gm(g) 可能发生交换（Kunkle 等，1969b）。这表明γ3 和 γ1 基因，γ4 和 γ2 基因之间各自是直接连锁的。另一方面，由于γ3 和 γ1 基因之间不等交换（unequal homologous cross-over）产生的“Lepore”型杂种 IgG 分子的发现，表明γ3 和 γ1 基因是直接连锁的；并且，由于分子 N 端部分是来自 γ3，而 C 端是来自 γ1，推测 γ3 基因应位于γ1 基因的靠 N 端一侧（图 15-3）。综合起来，这些资料提示四个亚类γ链的 C 基因在染色体上的排列次序可能是：γ4-γ2-γ3-γ1（图 15-4）。

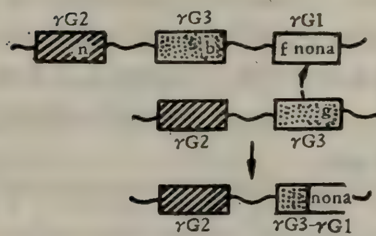


图 15-3 两个 IgG 基因复合物不等交换产生之杂种基因，编码 IgG_3Fab-IgG_1Fc 分子。杂交基因缺少所有常规的 Gm 标记，而保留 non-a 标记（据 Kunkel 等，1969）。

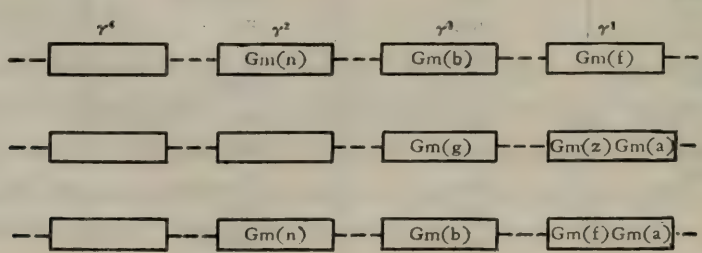


图 15-4 人γ-重链四个亚类的C基因在染色体上假定的排列顺序。上两排示白种人的两个主要的等位基因复合物。下面一排示黄种人的一个等位基因复合物，存在基因内交换现象（据 Fudenberg，1972）。

已知 IgA_2 和 IgG 紧密连锁（Kunkle 等，1969b）。很可能 IgA_1，以及 IgM，IgD，IgE 等所有重链 C 基因一起构成一个大的连锁群。不过，IgA_1，IgM，IgD 和 IgE 的位置和次序还不清楚。有人推想或许应放在 IgG 顺反子的靠 N 端一侧，因为它们和 IgG_4 比和 IgG_1 更相似一些（Natvig 和 Kunkle，1973）。

（二）家　兔

Qudin（1956）最先发现家兔免疫球蛋白存在同种异型决定簇，继之进行了广泛的研究。目前已知家兔的主要同种异型专一性，分别位于各类重链、两型轻链及分泌片上（表 15-6）。从表可见，几类重链的易变区上都存在 a，x，y 同种异型群；γ 链的不变区存在d，e 群；α 链的不变区存在 f，g 群；μ 链的不变区存在 n 群；κ 轻链存在 b 群；λ 链存在C 群；分泌片存在 t 群(图 15-5)。

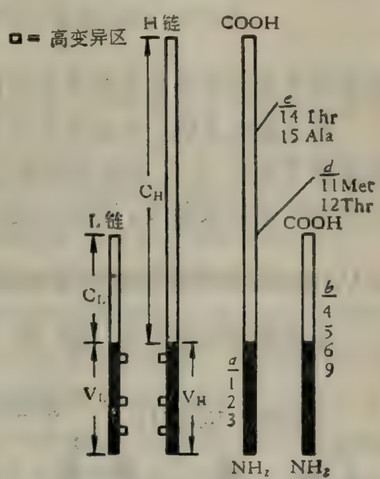


图 15-5　家兔 IgG 的同族异型（据 Kindt 等，1974）。

对家兔免疫球蛋白同种异型的遗传分析证明控制免疫球蛋白合成的基因分属于重链、κ 轻链和 λ 轻链三个连锁群。最近还发现分泌片的同种异型同上述任一同种异型均不连锁，因而是属于第四个独立的连锁群。

家兔免疫球蛋白的特点是重链易变区存在遗传标记。已证明 a 群同种异型位于 V_H 区。已知同种异型专一性和 V_H 区肽链顺序变异的关系，列于图 15-6. 从图上可见，三种同种异型肽链上，两个同种异型肽链的顺序相近，而第三个的差别很广泛（特别是在67—71 位置）（Frangione，1975）。这里需要指出的，家兔位于重链 V 区的 a 群和 κ 轻链的 b 群同种异型可能涉及许多个氨基酸的互换。这是和 d 群，e 群只

表 15-5　家兔免疫球蛋白的主要同种异型

链上位置	同种异型群	同种异型专一性
重链		
易变区（γ，α，μ，ε 重链）	a	1, 2, 3
	x	32
	y	33
不变区 IgG	d	11, 12
	e	14, 15
不变区 IgA_1	f	69, 70, 71, 72, 73
不变区 IgA_4	g	74, 75, 76, 77
不变区 IgM	n	81, 82
κ 轻链	b	4, 5, 6, 9
λ 轻链	c	7, 21
分泌片	t	61, 62

（据 Kunkel 和 Kindt，1975）。

同种异型　　　　　　　　　　　　H链位置

	1	5	10	15
a1	pGlu-Ser-Val/Leu	-Glu-Glu-Ser-Gly-Gly-Arg-	Leu-Val-Thr-Pro-Thr-	Pro-Gly
a2	————————Lys	————Glu —— Gly	——Phe Lys	————Asn Thr
a3	————Leu	————————————	Asp/Val ————Lys——	Gly Ala Ser

	67　　　70	81　　　85
a1	Phe-Thr-Ile-Ser-Lys	Ser-Leu-Thr-Thr-Glu-Asp
a2	Ser————Thr Arg	————————Ala Gln——
a3	——————————	————————Ala Ala——

图 15-6　家兔重链易变区可能和同种异型 a 群氨基酸排列顺序变异有关的肽段(据 Kunkel 和 Kindt, 1975)。

涉及单个氨基酸的置换是不同的(图 15-5)。

由于家兔重链上同时存在两个同种异型决定簇，一个位于 V 区，一个位于 C 区，这就提供了研究 V, C 基因在遗传上的关系的条件。实际上，关于编码抗体 V 区基因的知识大部分来自家兔 V_H 同种异型的研究。

1. V_H 和 C_H 同种异型的连锁和交换

早期观察已经发现 IgG 和 IgM 具有相同的 V_H 同种异型 (Todd, 1963)。随后，又发现 IgA 和 IgE 也同样具有相同的 V_H 同种异型 (Kindt 和 Todd, 1969)。另一方面，还发现位于 γ 链 C 区的 e 和 d 群决定簇与位于 V 区的 a 群决定簇是连锁的 (Tosi 等, 1970; Mage, 1971)。对这些事实可能的解释是各类和亚类重链的 C_H 部分是一串连锁的顺反子的产物，它们具有共同的 V_H 基因。如果 V_H 基因 (a 标记) 和 C_H 基因是以连续一串顺反子的形式位于一复杂的基因座内，就可能测出它们之间的交换频率。对家兔的家族分析发现 V_H 基因 (a 标记) 和 C_H 基因 (d 标记) 之间确实存在交换，交换频率约为 0.5—0.7% (Mage 等, 1971; Kindt 和 Mandy, 1972)。这一事实有力地证明重链的 V 区和 C 区是受不同的，然而是连锁的基因控制的。总之，这些事实都支持 V_H基因和 C_H 基因连结成一个 VC 基因，决定重链合成的假说。

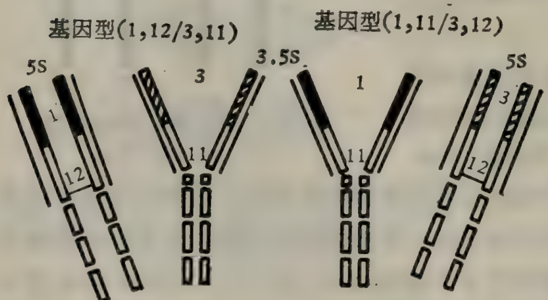


图 15-7　IgG 之 V_H 和 C_γ 区等位基因互斥现象。V_H 和 C_γ 遗传标记的分子关系反映了这些标记在染色体上的连锁关系。当用 CNBr 处理时，带 A11 同种异型标记的 IgG 产生3.5 S 片段，而 A12 标记的 IgG 产生 5S 片段。因此，在基因型为(1, 12/3, 11) 的家兔，a3 标记仅在 3.5S 片段上发现；反之，在基因型为 (1, 11/3, 12) 的家兔，3.5S 片段上只发现 a1 标记(据 Kindt 等, 1970)。

此外，对于 V 和 C 同种异型为双重杂合子的动物之免疫球蛋白上的这些遗传标记组合的研究，发现亲代遗传标记的组合能以很高百分率保存下来。也就是说，父母双方的这两组遗传标记从亲代到子代是各自相连在一起遗传的。例如，双亲的基因型为：

$$(a^2, d^{12}/a^2, d^{12}) \times (a^1, d^{11}/a^1, d^{11})$$

产生的双重杂合子代的基因型应为 $(a^2, d^{12}/a^1, d^{11})$，其循环抗体具有 a1 同种异型标记

的分子将表现 d11 同种异型标记；而具有 a2 标记的分子将表现 d12 标记（Kindt 等，1970）。这一实验除去说明 V_H基因（a 标记）和 C_H 基因（带 d 标记）是相连在一起遗传外，还说明可能存在等位基因互斥现象。Kindt 等（1970）利用 γ 链的 A11，A12 标记和 V_H 的 a1，a3，Landucci-Tosi 等（1970）用 γ 链的 A14，A15 标记和 a1，a2 标记，也证明至少 95% 的 IgG 分子的 V，C 遗传标记都呈现等位基因互斥现象（图 15-7）。这些事实还提示大多数抗体合成细胞是利用位于同一条染色体上的 V_H 和 C_H 基因来合成重链的。

2. 同种异型的等位基因互斥现象

上述免疫球蛋白同种异型等位基因互斥现象是哺乳类常染色体等位基因互斥的唯一例子。对于遗传上为杂合子的动物，虽然某一同种异型基因座的两个等位基因都可能表现出来，但在个别免疫球蛋白分子上却只能发现两个交替的等位基因中一个基因的产物。也就是说，个别免疫球蛋白分子的两条重链和两条轻链都各自具有相同的同种异型，而不会出现两条链有不同遗传标记的杂种分子。对这一现象的解释是个别合成抗体的浆细胞内，决定免疫球蛋白肽链同种异型的任何一对等位基因中，只有一个得以表现出来。然而，就整个浆细胞群来说，仍可观察到父方或母方同种异型的各种组合，呈现表型上的嵌合现象（图 15-8）。已知 a 群（位于 V_H）和 b 群（位于 κ 链）是不连锁的（可能位于不同染色体上），这就要求这两个基因座的等位基因各自独立地选择地表现（激活或抑制）。如把 λ 轻链的同种异型也算在内，浆细胞内等位基因的选择表现就可能涉及位于四条常染色体上的四个不同的基因座（Tosi 等，1974）。由此可见，同种异型等位基因互斥产生的机制可能是相当复杂的，目前还不太清楚。前一章（参看460页）已提到，细胞杂交研究结果提示抗体合成细胞内，等位基因表现的限制可能发生在 V-C 基因整合阶段；已整合的 VC 基因，不论有无其他整合的 V-C基因存在，均能表现出来，而未整合的其他基因则不能表现（Cotton 和 Milstein，1975）。这一解释在下一节讨论 VC 基因整合的机制（基因移位）时，还要谈到。最后，还应注意到这样一种可能性，某些呈现"等位性"的同种异型实际上可能是染色体上一个复杂基因座中一串连锁的顺反子的产物。它们之所以在表面上显现出"等位性"可能是由于控制它们的调节基因呈现等位性的结果。这方面的证据是有人观察到基因型为 (a^1, a^3 / b^4, b^5) 的家兔，在用 Micro-

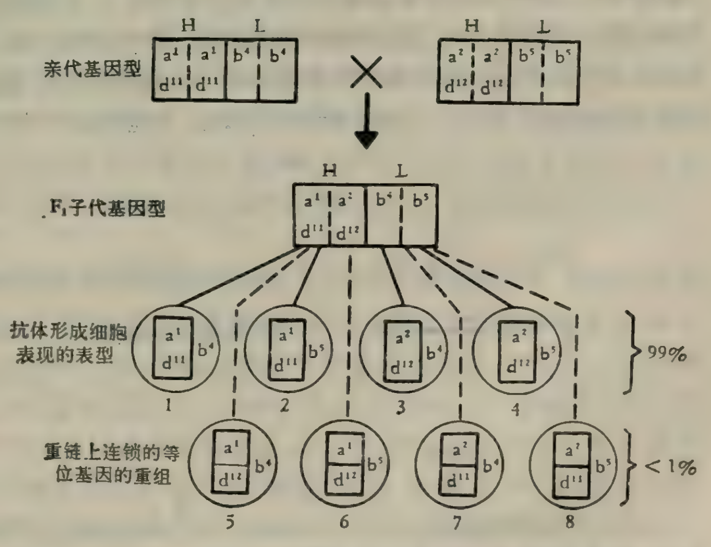


图 15-8　基因型为 $a^1a^2/b^4b^5/d^{11}d^{12}$ 的家兔的抗体形成细胞的表型。5—8 细胞表现 a 和 d 等位基因重组的表型（据 Kunkel 和 Kindt，1975）。

coceus lysodeikticus 免疫后产生的抗体出现意料不到的同种异型标记（a^2b^6）（Strosberg 等，1974）。

总之，家兔 γ 重链以及 κ，λ 轻链的 V 区和 C 区遗传标记的存在使有可能发现 V_H 和 C_γ 基因的连锁关系，而 V_H，κ 和 λ 链的 a，b，c 基因座之间没有密切的连锁关系。对这些遗传现象的解释是可能存在三套不同的 V 区亚群，即重链的，κ 和 λ 轻链的。有理由认为至少存在三个不同的基因座，各相当于重链、κ 和 λ 轻链的 V 和 C 区的结构基因。一个分化的抗体形成细胞，假定从一群 V_H 基因中选择一个，并将它移位到同一染色体的几个 C_H 基因中的一个上面，连接成一个 VC 基因（Galley 和 Edelman，1970）。同样地，轻链亦复如此。根据上述各方面遗传学研究资料，家兔免疫球蛋白重链、κ 和 λ 轻链同种异型标记在几对染色体上假想的排列位置，可举一只兔子的情况，作为代表（图 15-9）。

3. 个体型和 V 区同种异型（"a"群）的遗传关系

如前述，个体型位于免疫球蛋白肽链的 V 区，可能和组成抗原结合位点的高变异区（HV）有关连。因此，也可以作为 V 区的遗传标记。家兔家族遗传分析结果表明个体型标记是能遗传的。并且是和 a 群同种异型连锁的。其次，至少一种个体型是和一定的 V_κ 亚型连锁的。

虽然个体型和 V 区同种异型在遗传上是相关连的，半抗原抑制实验证明它们又是有区别的。链球菌 c 族多糖半抗原能抑制抗个体型抗血清和相应的抗体的反应，但不能抑制抗 a 群同种异型抗血清和同一些抗体的反应。这一实验说明 a 群同种异型和个体型虽同位于 V 区，但又各有不同的抗原决定簇（Kindt 等，1974）。进一步研究还发现从一只基因型为（a^2a^3）的家兔分离的两个具有不同的 V 区同种异型标记的抗体，（一个抗体为 a3，另一可能为 y），可能具有相同的个体型（Kunkel 和 Kindt，1975）。另外，也有人发现个体型专一性呈现交叉反应的两个人髓细胞瘤蛋白质，具有不同类、型的重链和轻链（Hopher，1973）。这些发现提示 V 区可能再划分为恒定部分和高变异部分，前者

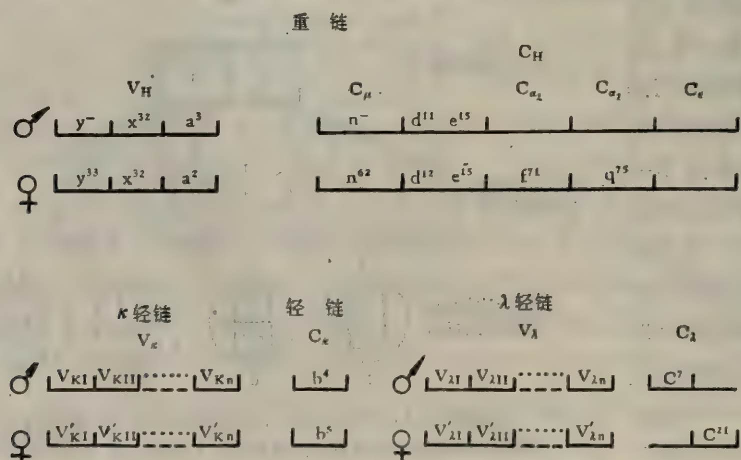


图 15-9 根据同种异型遗传确定的家兔免疫球蛋白合成有关的基因座。a，x 和 y 群的 V_H 基因存在单个或多个复本，还不清楚。V_L 区亚群的观察提示可能存在多个 V_L 基因复本（据 Kunkle 和 Kindt，1975）。

是由少数几个和同种异型有关的基因编码，后者为和它们不同的一组基因编码。也就是说，V 区是由不只一个基因编码的。这些基因可能以某种方式相互作用，形成完整的 V 基因。可以进一步设想 V 区同种异型有关基因编码维持 V 区恒定结构的肽链骨架，而 V 区抗原结合位点的多样性是由于和个体型有关的高变异区插入的结果（Kindt 和 Mole, 1974; Kunckle 和 Kindt, 1975）。曾有人假定这种插入可能是通过"染色体外基因"实现的（Wu 和 Kabat, 1970）（参看第十章，283 页）。V 基因是否确实存在这种假设的双重结构，需要弄清楚 V 基因本身的排列顺序，才能得到直接的证明。

由于家兔重链 V 区存在双重遗传标记，对具有确定个体型和同种异型专一性的重链 V 区的结构和遗传的研究，可能对于了解抗体多样性的起源有关键的意义。

（三）小　鼠

小鼠作为免疫遗传学研究材料有许多优点，如有许多纯系和浆细胞瘤可供使用。不过，缺点是已肯定的同种异型标记限于重链 C 区。这一缺点部分地可用个体型作为 V_H 区标记，得到补偿。

Kelus 和 Moor-Jankowski (1961) 最先记录小鼠的同种异型。当他们用 BALB/C 纯系小鼠的抗体免疫另一纯系 $C57B_l$ 时，产生的抗同种异型抗体能和所有 BALB/C 和 C_3H 小鼠免疫球蛋白的一个抗原决定簇起反应，而不和 $C57B_l$ 的免疫球蛋白反应。目前发现小鼠 IgG 重链的三个亚类（ϕ，γ，η 链）和 IgA 重链（α 链）的 C 区都存在同种异型标记，有关的基因座分别称为 F, G, H, A。IgG_3（γ_3 或 ι 链）和 IgM（μ 链）以及 κ, λ 轻链尚未发现同种异型标记。关于小鼠同种异型的详细资料可参看 Mage 等 (1973) 的综述。

利用遗传标记发现小鼠各类重链的 C_H 基因是紧密连锁的，形成所谓的"重链连锁群"。纯系小鼠同种异型连锁群，通常用该纯系名称表示。例如，BALB/C 的 C_H 基因连锁群为($G^{1,6,7,8}$, $A^{12,13,14}$, $H^{9,11,22}$, $F^{18,19}$)，简称为"BALB/C"同种异型。在重链连锁群彼此有两个或更多基因差别的纯系小鼠之间的杂交实验指出，在 2371 子代内，未发现重组。这表明这些带有 C_H 同种异型标记的基因之间的重组频率是很低的，或者说它们是紧密连锁的。

利用小鼠抗体的个体型作为 V 区遗传标记，同样观察到 V 基因和 C_H 基因存在紧密的连锁。Eichmann (1972) 发现 A/J 纯系小鼠不同个体产生的抗链球菌多糖 A 抗体存在交叉反应的个体型决定簇。这些实验发现在一定基因型的同一纯系的不同个体可能得到具有相同或相似的个体型决定簇（V 区构造）的抗体，而在另一些基因型的纯系个体则不能，从而开辟了深入研究个体型遗传的途径。对于同种异型为杂合子的小鼠所产生的有交叉反应个体型决定簇的抗体，总带有相同的个体型-同种异型组合（Eichmann, 1973）。这进一步提示控制个体型的基因可能和 C_H 基因位于同一条染色体上。此外，还观察到 A/J 纯系小鼠的两个不同的个体型（A5A 和 ARS）都与 A/J C_H 同种异型连锁。并且，在一支雄性杂种小鼠（A/J · BALB/C）还观察到 A5A 个体型与 BALB/C 同种异型之间的交换现象，于是便提供了分析两种个体型（A5A 和 ARS）之连锁关系的机会。用这一支小鼠进行交配繁殖，重组的单元型（表型群）可以遗

传下去，并证明没有 ARS 个体型。根据这些资料，便可以把 BALB/C，A/J，重组体的遗传标记在染色体上的分布表示为：

	V_H 个体型	C_H 同种异型	
A/J	A5A⁺	ARS⁺	1·e
BALB/C	A5A⁻	ARS⁻	1·a
重组体	A5A⁺	ARS⁻	1·a

这些观察提示 V 基因数目相当多，足以观察到它们之间的交换，从而还提示有可能通过这一类实验制作出小鼠 V_H 基因图（Eichmann 等，1974）。

最后，还要提到有人注意到某些品系小鼠 κ 轻链 V_L 区的一个肽段可能作为遗传标记，称为“I_B-肽段”（Edelman 和 Gottlieb，1970）。后来，又发现 I_B-肽段和 T 细胞表面抗原 Ly3-1 连锁（Gottlieb，1974）。根据这种连锁关系，可以推测小鼠的 V_L 基因可能是位于 6 号染色体（XI 连锁群）上的（Itakura 等，1972）。

总结起来，根据人、家兔和小鼠免疫球蛋白遗传标记的研究，对于免疫球蛋白遗传控制可以得出几点重要的结论：

1）重链和轻链的同种异型标记是遵守 Mendel 定律的方式遗传的，并且不存在性连锁。有证据提示重链 C 区的每一个结构基因，只有一个复本；

2）免疫球蛋白重链，λ 和 κ 轻链的合成是受位于常染色体上，彼此不相连锁的三大群基因编码的；而重链的类别和亚类又是由彼此连锁的不同的结构基因编码的。目前已证明人类重链基因位于第六号染色体上（Smith 和 Hirschorn，1978），小鼠 κ 轻链和重链分别位于第六号和第十二号染色体上（Hengartner 等，1978）；

3）免疫球蛋白的多肽链（重链或轻链）是受两个不同的基因，V 和 C，控制的，即两个基因决定一条肽链。这要求在一定发育时期存在连接 V，C 基因的特殊遗传机制；

4）对于大多数抗体分泌细胞，一定时间只有一个亚类的重链基因和一个型的轻链基因被激活。同时，任何一对同种异型等位基因中，只有一个能表现出来，即存在等位基因互斥现象；

5）V 和 C 基因的数目。根据遗传学分析资料，可以假定 C 区结构基因的数目不多，

人		V-基因	C-基因
轻链	κ	$\overline{\text{Ia}}$ $\overline{\text{Ib}}$ $\overline{\text{II}}$ $\overline{\text{III}}$	—
	λ	$\overline{\text{I}}$ $\overline{\text{II}}$ $\overline{\text{III}}$ $\overline{\text{IV}}$	$\overline{\text{Arg}}$ $\overline{\text{Lys}}$ $\overline{\text{Gly}}$
重链		$\overline{\text{I}}$ $\overline{\text{II}}$ $\overline{\text{III}}$	$\overline{\gamma 4}$ $\overline{\gamma 2}$ $\overline{\gamma 3}$ $\overline{\gamma 1}$ $\overline{\alpha 1}$ $\overline{\alpha 2}$ $\overline{\mu 2}$ $\overline{\mu 1}$ $\overline{\delta}$ $\overline{\varepsilon}$

小鼠		V-基因	C-基因
轻链	κ	$\overline{\text{I}}$ $\overline{\text{II}}$ $\overline{\text{III}}$ $\overline{\text{IV}}$ $\overline{\text{V}}$ $\overline{\text{VI}}$ $\overline{\text{VII}}$ 等	—
	λ	$\overline{\text{I}}$ ($\overline{\text{II}}$)	$\overline{\text{I}}$ $\overline{\text{II}}$

图 15-10 人类免疫球蛋白和小鼠轻链基因的最低数目和可能的排列。每一横排上的基因假定是位于同一条染色体上。小鼠 V_κ 基因的最低数目可能超过 8，第二个 V_λ 基因的存在还不肯定（据 Milstein 和 Munro，1973）。

大约相当于同族专一性的总和。如在人类至少存在10种 C_H 基因和4种 C_L 基因。根据连锁和交换等资料，还可以大致确定它们在染色体上的排列顺序至于V区结构基因的数目问题，则更为复杂。显然，在高等脊椎动物可能存在相当于重链，κ 和 λ 轻链的三类V基因，即 V_{κ}，V_{λ}，和 V_{κ} 基因；而每一类中又存在不少于肽链V区亚群数目的V基因，如人类可能有3个 V_H，4个 V_{κ}，和4个 V_{λ} 基因（Milstein 和 Munro，1973）（图15-10）。V基因的数目和构造是抗体多样性起源的关键问题，将在下一节讨论。

二、免疫球蛋白的基因结构和抗体多样性的起源

抗体多样性起源及其遗传控制是现代免疫学至今争论未决的中心问题。从上述遗传学研究结果，已经对免疫球蛋白的肽链结构基因的最低数目和在染色体上的排列有了初步的认识；并且有证据提示一个相同的C基因可能和若干不同的V基因连接成一个VC基因，决定抗原结合位点易变区的多样性。然而，一些关键问题仍未得到解决。在一个体中V基因究竟存在多少种变异形式？V区是由一个基因，还是几个基因相互作用编码的，是否存在相当于高变异区的DNA插入片段？V和C基因又是通过什么机制连接起来，共同编码一条肽链？这些问题都需要在分子水平对抗体合成细胞的基因组及免疫球蛋白基因结构进行分析，才可望得到解决。

（一）免疫球蛋白基因结构和移位机制

随着免疫球蛋白肽链 mRNA 的纯化，以及其基因的分离、扩增的成功，目前已可能通过分子杂交估计抗体合成细胞内V基因的数目和排列方式，甚至直接分析V基因的全部一级结构。现将这些方面的结果，简述如下：

1. 免疫球蛋白肽链 mRNA 的结构

Ig链 mRNA 及其反转录的 c-DNA 可以作为分子杂交的探测分子（Probe）来估量细胞内免疫球蛋白基因复本数目和排列方式。为了进行分子杂交实验，就应知道 Ig 链 mRNA 的构造。其次，虽然有许多证据表明重链和轻链的合成是各自受一个完整的 mRNA 控制的，并提示V，C基因的连接可能发生在转录或转录前的水平。但是，这一假定还需要从 Ig 链 mRNA 的构造得到直接的证明。

Milstein 实验室初步测定了小鼠骨髓瘤 MOPC21 轻链 mRNA 的排列顺序，包括 T_1 核糖核酸酶酶解片段（包括25个寡聚核苷酸），以及3′端非翻译区（UT）内邻近 poly A

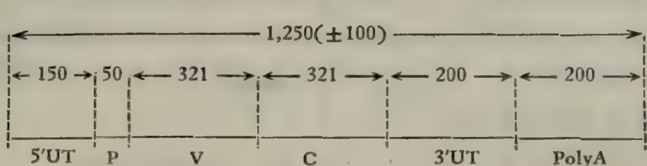


图15-11 MOPC21 轻链 mRNA 构造，示各区域的长度。mRNA 全长约为1,250核苷酸，5′UT 为5′端不翻译部分，3′UT 为3′端不翻译部分，P为前体区域（据 Milstein 等，1974）。

的 52 核苷酸的排列顺序（Milstein 等，1974）。 同样地， 又测定了 MOPC21 重链 mRNA 的部分排列顺序 （Cowan 等，1976）。 根据这些初步结果，可以确定轻链 mRNA 的大体构造和各区域的长度，并证实一个单一的 mRNA 分子含有轻链 C 区和 V 区全部顺序的信息，并且 V 区和 C 区是紧密相连的(图 15-11)。

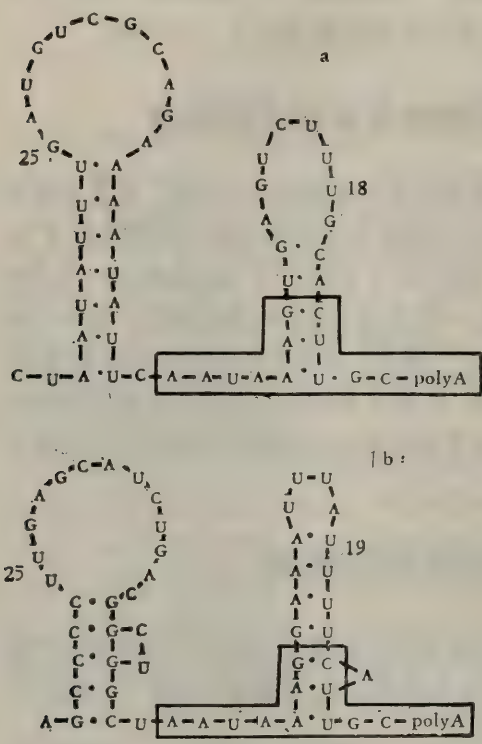


图 15-12 小鼠免疫球蛋白轻链 mRNA 之 3′ 端(a)同家兔 β 珠蛋白 mRNA 之 3′ 端 (b) 的比较。方框内为同源的顺序，数字示环的核苷酸总数（据 Proudfoot 和 Brownlee, 1974）。

顺便提及，有人发现免疫球蛋白轻链 mRNA 之 3′ 端顺序和珠蛋白 mRNA 相应部分是同源的，并且可能具有两个特殊的发夹状构造(图 15-12)。它们或许可能在 mRNA 从核内到核糖体的转运中或降解速度的调控中起识别作用 （Proudfoot 和 Brownlee, 1974）。

2. 基因移位机制

瑞士巴塞尔免疫学研究所的 Hozumi 和 Tonegawa （1976）利用核酸分子杂交方法研究小鼠胚胎和分化细胞（瘤细胞）之 V, C 基因在 DNA 上的分布。将从 12—13 天鼠胚和 MOPC321 浆细胞瘤(分泌 κ 轻链）分离的 DNA，用 BamHI 限制性核酸酶酶解，再经过琼脂糖电泳分离成大小不同的片段。然后，同 ^{125}I-MOPC321 κ 链 mRNA 或它的靠 C 端半段(含 C 区）进行分子杂交，以测定 κ 链的 V 区和 C 区在 DNA 片段上的分布。结果发现胚胎 DNA 的两个大的片段(600 万道尔顿和 390 万道尔顿）都能同完整的 κ 链 mRNA（含 V 和 C 区)杂交。可是，只有分子量较大的片段(600 万道尔顿)才能同 κ 链 mRNA 的 3′ 端半段(只含 C 区）杂交。因此，C 基因应位于较大的片段上。 另一方面，成体细胞（MOPC321）只有一小段 DNA（240 万道尔顿）能同时和 V 基因，C基因杂交。对这些观察结果的解释是 $V_κ$ 和 $C_κ$ 基因在胚胎期 DNA 上的分布可能相距很远，而在淋巴细胞分化过程中，通过某种方式的移位，许多 $V_κ$ 基因中的一个移动到 C基因附近，并同它连接起来了（图 15-13)。 通过这种移位重排的结果，VC 基因连成

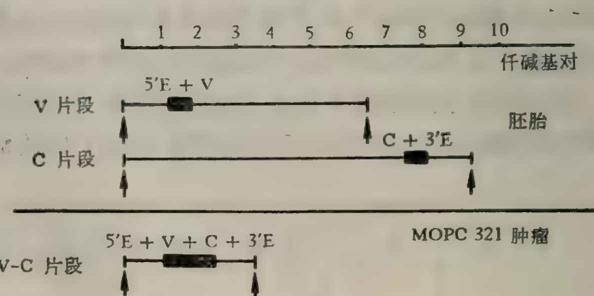


图 15-13 小鼠经 BamHI 限制性内切酶作用产生之 DNA 片段，带有 $V_κ$ 和 $C_κ$ 基因。箭头示 BamHI 酶的切点，5′E 和 3′E 指 κ 链 m-RNA 分子在 5′-和 3′-端的不翻译部分（据 Hozumi 和 Tonegawa, 1976)。

一体，并以这种形式进行转录，结果产生的 mRNA 分子便具有 V 区和 C 区的全部信息。

至于 V 基因移位的具体方式，曾经提出过许多种设想的模型(图 15-14)。 除去“复本-插入”模型(图 15-14，A) 外，其他三个模型(图 15-14，B，C，D) 都是和目前的实验事实相容的。除此以外，还提出过其他几种模型，可参看 Williamson 和 Fitzmaurice (1976)，这里不再赘述了。

已知抗体形成细胞只产生一种专一性的抗体。更具体地说，只表现一个 V 基因。如果存在多个 V_κ 基因，就必须有一种机制来保证只激活一个特定的 V_κ 基因。根据上述发现，可以设想当一个 V 基因通过移位和 C 基因连接时，这件事本身就可能激活这两个基因。同理，还可以进一步解释“等位基因互斥”现象，即只有已连接的 VC 基因上面荷载的同种异型标记才能表现出来。并且还可以假定这一条同型染色体还可能通过倍增或体细胞交换而成为纯合子的 (Hozumi 和 Tonegawa，1976)。

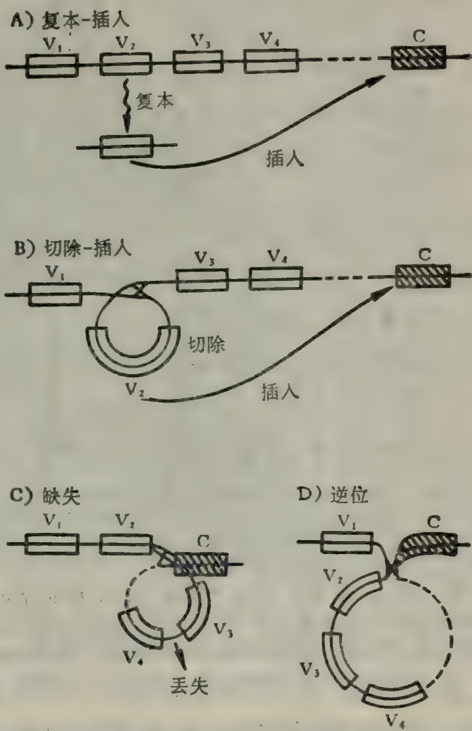


图 15-14 V-C 基因在 DNA 水平连接的模式图 (Hozumi 和 Tonegawa，1976)。

3. 免疫球蛋白的基因结构。 插人顺序的发现。

同一组工作者还采用遗传工程技术来研究免疫球蛋白的基因结构。其原理是把分离的基因和一定的载体(质粒或噬菌体)在体外重组后，引入细菌，进行扩增。这样得到大量的，均一的无性繁殖的DNA(Cloned DNA)，便可以供进行基因组或基因结构分析之需(Tonegawa 等，1977；Brack 和 Tonegawa，1977)。 他们先从 HOPC2020 浆细胞瘤的 DNA 之 EcoRI 酶解片段分离和浓集含 Ig 基因的 DNA 片段。 将这些 DNA 片段同 λgt Wam403 噬菌体的基因组重组后，转移到大肠杆菌 (E. coli 803) 内扩增， 并用 ^{125}I-λ 链 mRNA 进行原位杂交，筛选出各种含 Ig 基因的菌株。 利用这种方法，他们从浆细胞瘤 (HOPC2020) 得到了一个含有V_λ 和 C_λ 基因的无性繁殖 DNA (Ig303)的菌株 (Brack 和 Tonegawa，1977)。 将这样得到的 Ig303DNA 片段 (7.4 仟碱基)同 λ 链 mRNA (HOPC2020)进行分子杂交，然后用电子显微镜观察两条链的互补配对的情况。 在所采用的杂交条件 (57°C，0.56M Na^+，70%V/V 甲酰胺)下，DNA 片段完全变性，mRNA 同互补的(非密码的) DNA 单链杂交。 结果形成一个单链的 DNA 环，其两侧各有一个杂交区段，随后各自再延伸为单链的臂 (图 15-15)。然后，可见 R 环(R-loop) 分两步形成。 当在 25°C继续保温时，另一条密码 DNA 链可能再和这一构造的左右臂互补结合 (图 15-16，a)；最后再扩展到和两个杂交区段之间的单链 DNA 环互补结合，形成一个三环构造 (Triple loop)图15-16，b。 根据对许多杂交构造的测量得到各区段的长度列于表 15-6。从表上的数据可

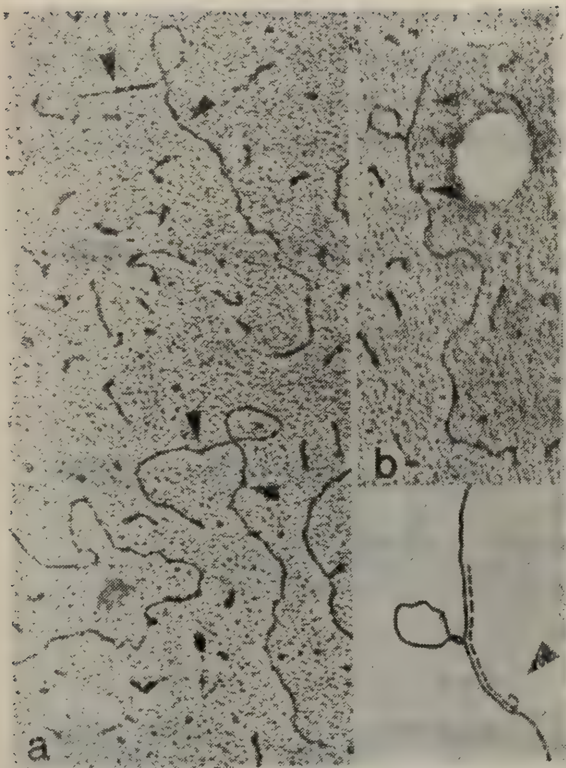


图 15-15 变性的 Ig 303 DNA 片段和 HOPC2020mRNA 退火时形成的杂交构造。箭头示 DNA×RNA 杂交区段的终点，注意 b 图上，较长的杂交区段的末端有一短的尾巴（如右下角简图上，箭头所示）（据 Brack 和 Tonegawa, 1977）。

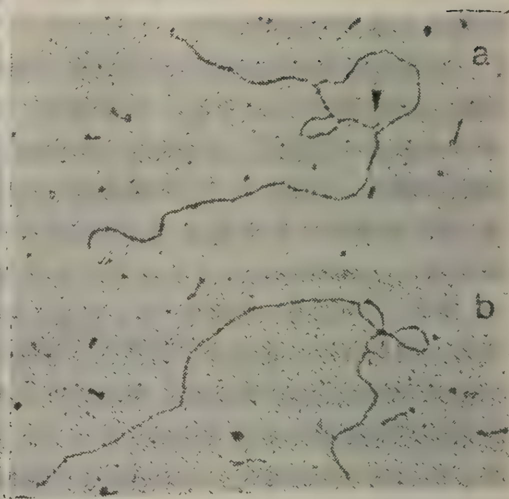


图 15-16 Ig303DNA 和 HOPC2020 mRNA 形成 R 环构造的两步骤(据 Brack 和 Tonegawa, 1977)。

见，一个杂交区段（466±40 核苷酸）比另一个（380±30 核苷酸）略长些。在电镜图片上，较长的区段常常拖着一条短的“尾巴”（50—100 核苷酸长度，可能相当于 mRNA 之 3′ 端 PolyA 部分），位于 DNA 片段靠右端（图 15-15,b）。因此，根据已知轻链mRNA 的分子构造（图 15-11），这提示较长的同源区段是 C 基因顺序，而较短的区段是 V 基因顺序。利用胚胎的一个 V_λ 基因片段（Ig13 HaeIIIB片段，1.5 仟碱基）同 Ig303 DNA 片段（7.4 仟碱基）杂交进一步证实较短的同源区就是 V 基因顺序(图 15-17)。根据这些观察资料，可以作出 V_λ 和 C_λ 基因在 Ig303 DNA 上的分布图，结果发现 V_λ 和 C_λ 基因之间存在相隔 1250 碱基的插入片段（或间隔片段）(图 15-18)。由于 Ig303 无性繁殖DNA 来源于一种产生 λ_1 链的浆细胞

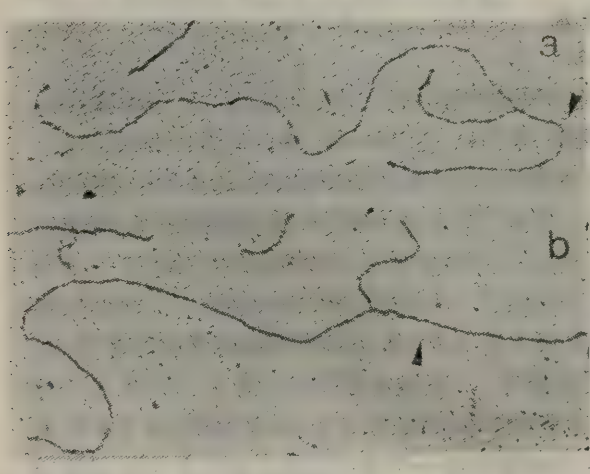


图 15-17 Ig303DNA 和 Ig13HaeIIIB 片段形成的杂交构造。Ig13 片段的一端和 Ig303DNA 相应的V区杂交，箭头示杂交终止点(据 Brack 和 Tonegawa, 1977)。

表 15-6 Ig303DNA 分子杂交构造的长度测量

杂交构造类型	左臂	右臂	"C 基因"	"V 基因"	间隔顺序
RNA·DNA 杂交分子 Ig303×HOPC2020 mRNA(n = 23)	3.75±0.37	1.49±0.16	0.480±0.027	0.388±0.027	1.30±0.13
R-环 Ig303×HOPC2020 mRNA(n = 53)	3.75±0.20	1.66±0.08	0.440±0.040	0.380±0.030	1.20±0.09
杂交分子 Ig303×Ig13 HaeIIIB 片段 (n = 25)	5.44*±0.50	1.58±0.12	—	0.360±0.023	—

注：Ig303DNA 各区段的长度是根据图 15-15a, 15-15b, 15-15c 的杂交分子构造的电子显微照片直接测量的。每一区段的平均长度和标准误均用仟碱基 (Kb) 单位表示。n = 测量的杂交分子的数目。* 包括"C 基因"和间隔顺序(据 Brack 和 Tonegawa, 1977)。

瘤，而不是胚胎细胞。Ig303 DNA 片段的 V，C 基因应该已经经历过移位重排。后来，他们又得到了 7.5 仟碱基胚胎C_λ基因片段和 3.2 仟碱基胚胎 V_λ 基因片段的无性繁殖 DNA。电子显微镜检查这两种无性繁殖DNA 和 Ig303DNA 的杂交构造，同样含有 1,250 碱基长度的插入片段。因此，这种插入顺序不太可能是无性繁殖过程中产生的假象，而是在基因内原来就存在的。

总之，目前认为在胚胎期，免疫球蛋白的 V 基因和 C 基因彼此相距很远。在淋巴细胞分化过程中，特定的一个 V 基因发生移位，结果 V，C 基因靠近。但并不是紧密地连在一起，两个基因之间还有 1,250 碱基的间隔。如前述，轻链 mRNA 编码一条 V，C 区紧密连接的完整的多肽链。比较图 15-18 和图 15-11，可以看出 DNA 上存在于 V 基因和 C 基因之间的插入顺序是不翻译的。于是，便发生了一个有兴趣的问题，存在不翻译的插入顺序的 DNA 如何转录出编码一条连续的轻链 mRNA 呢?一种可能性是 RNA聚合酶能跳越过 V，C 区之间的间隔。另一种可能性是 DNA 先转录出一条保留着插入顺序的前 mRNA，然后在"加工"过程中通过特殊的"剪接" (Splicing) 机制，把不转录的部分去除掉。目前的证据支持后一种机制。

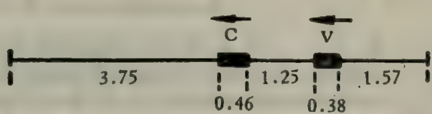


图 15-18 Ig303DNA 经 EcoRI 酶解的 7.4 Kb片段上，V和C基因的结构。各段长度用仟碱基(Kb)单位表示。箭头示转录方向(据 Brack和 Tonegawa, 1977)。

除免疫球蛋白基因外，目前还发现真核细胞的许多结构基因(如 β-珠蛋白基因、白蛋白基因和卵清蛋白基因等)内部都存在插入顺序(亦称间隔顺序或基因内含子)(参看 Gilbert, 1978; Marx, 1978; Williamson, 1978)。目前已经公认真核细胞结构基因内存在不翻译的插入顺序，因而把基因分隔成几段，表达的(编码顺序)外显子 (Exon) 和不表达的(非编码顺序)内含子 (intron)，相间排列。这是真核基因结构的一个重要特点，在原核基因没有发现过这种情况。

真核基因这种特殊结构有什么生物学意义呢?有人假定"剪接"机制的精确性是由核酸酶对 mRNA 基因内含子的特殊二级结构的识别专一性来保证的。因此，基因内含子边缘的点突变就不只是改变单个氨基酸，而且可能改变"剪接"地点，从而导致增加或丢失一段肽链。其次，"剪接"机制也不可能绝对准确，通过"移码"同一转录单位就可能产生完全不同的另一条肽链。总之，通过这些机制可能增加分子变异机会并加快分子进化的速度。

4. V 基因的结构

为了得到可供核苷酸顺序分析和足够数量的可供分子杂交的纯的探测分子，Leder 实验室利用从小鼠 MOPC-149 κ 轻链 mRNA 制备的 cDNA 与 pCR1-K40 质粒体外重组后进行无性繁殖，并开始进行 κ 轻链结构基因顺序的初步分析 (Seidman 等, 1978a)。另一方面，Tonegawa 等从鼠胚 DNA 的 EcoRI 内切酶酶解片段中浓集了一个含 λ 轻链基因的 4.8 仟碱基对的 DNA 片段。然后将这一 DNA 片段和噬菌体 λgt Wam403 体外重组后，转移到 E. coli803 内，成功地得到了含有 V_λ 基因的无性繁殖 DNA (λgt WE3-Ig13) (Tonegawa 等, 1977)。

Tonegawa 等 (1978) 最近报告了小鼠胚胎无性繁殖 V_λ 基因 (包含 750 碱基对的 DNA 片段) 的全部排列顺序。将根据 DNA 顺序推导出的肽链顺序同 λ_I 和 λ_{II} 链的 V

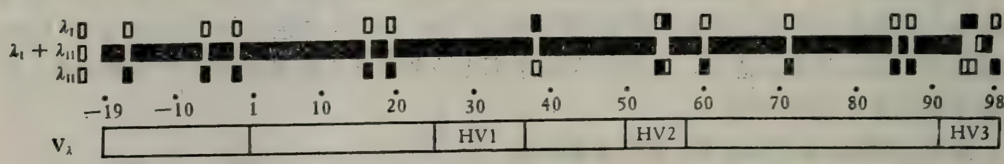


图 15-19 小鼠 λ_I 和 λ_{II} 轻链易变区和胚胎 V_λ 基因 DNA 比较的示意图。图中部几乎连续的粗黑线，示大多数轻链相同的氨基酸排列顺序，空格示它们不同的位置。黑方块示蛋白顺序和 DNA 顺序相符合的位置。在 λ_I 和 λ_{II} 链的 V 区之 15 个不同的位置中，DNA 和 λ_{II}(MOPC315) 符合的有 11 个位置，和 λ_I (MOPC104E) 一致的有 4 个位置(据 Tonegawa 等, 1978)。

区顺序比较，这一 DNA 片段的顺序和 λ_{II} 链的顺序更为符合(图 15-19)。因此，应是 $V_{\lambda_{II}}$ 基因，并且是来源于种质系的基因。图 15-20 列出了鼠胚 $V_{\lambda_{II}}$ 轻链基因之 DNA 顺序，以及同已知 λ 轻链氨基酸顺序的对比。从 $V_{\lambda_{II}}$ 基因 DNA 顺序图，可得出几点重要的结论：

1) DNA 顺序证实 V 区和 C 区之间确实存在插入顺序；并且疏水性领头段 (N 端 19 肽) 靠近轻链的结构基因，但彼此并不是连续的，领头段的大部分顺序和基因的其余部分之间相隔 93 碱基对的插入顺序；

2) $V_{\lambda_{II}}$ DNA 顺序中存在三段高变异区密码 (HV_1, HV_2, HV_3)。这说明在种质系基因顺序内部确实存在高变异区密码，这些 DNA 片段不是在体细胞分化过程中通过某种机制插入的。

总之，根据上述的实验结果，小鼠 λ 轻链有功能的基因具有下述结构：

领头段 (45 碱基对) 一插入顺序 (93 碱基对) —V 区 (306 碱基对) 一插入顺序 (1250 碱基对) —C 区 (348 碱基对)。在 V 区内还分布着三段高变异顺序 (HV_1, HV_2, HV_3)。

以上这几点是评价免疫球蛋白多样性起源的理论模型时，必须考虑到的直接证据。

5. "J" 基因片段和 V/J 连接

从 Tonegawa 工作组在 1976 年对免疫球蛋白基因结构的研究取得重大突破以后，近年来这方面的研究在国际上进展很快，竞争非常剧烈。除瑞士巴塞尔免疫学研究所 Tonegawa 实验室外，美国加州理工学院 Hood 实验室，国立卫生研究院 Leder 实验室，以及英国剑桥分子生物学实验室是主要的竞争对手。这些实验室对轻链和重链基因结构的深入研究，进一步揭示了基因移位机制的许多细节。对 NZB 纯系小鼠的 22 个浆

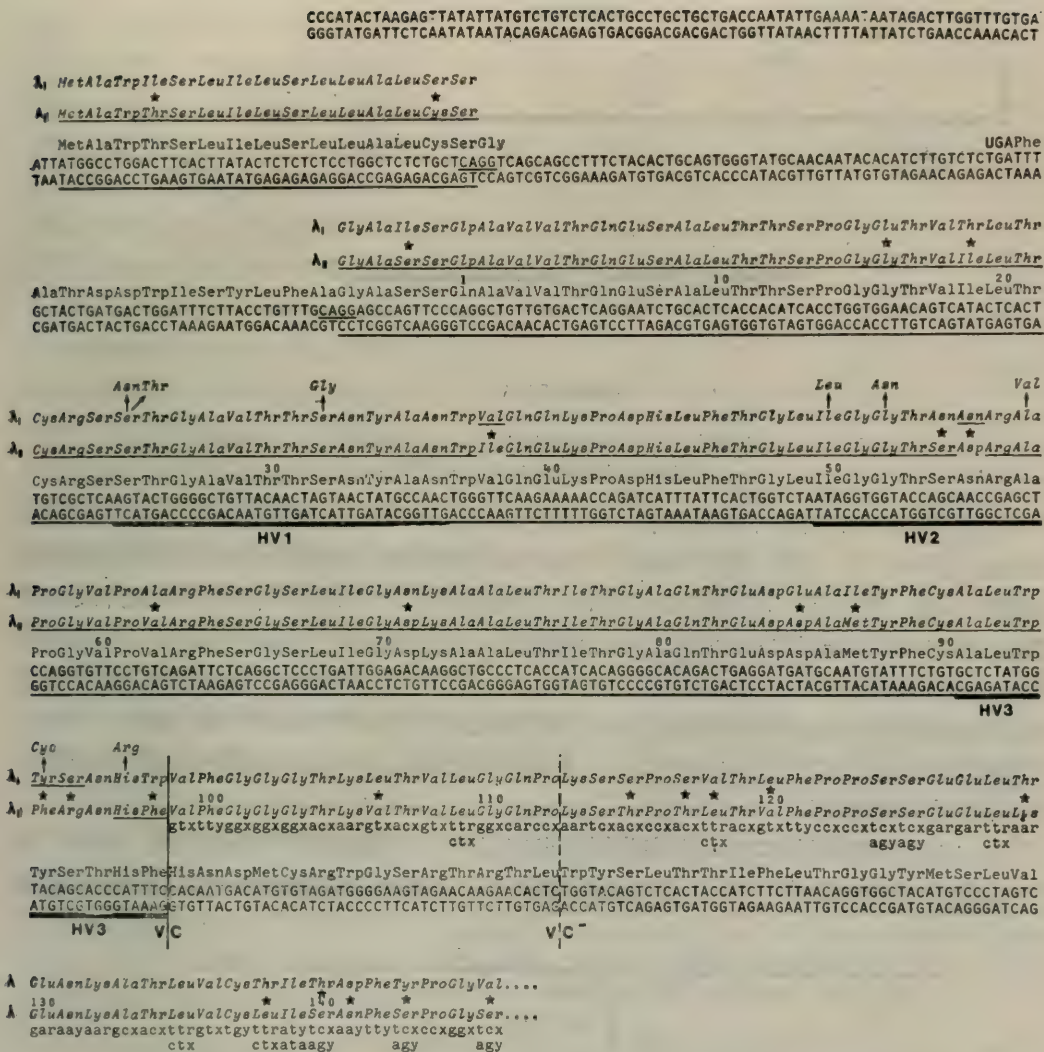


图 15-20 鼠胚 $V\lambda_{II}$ 轻链基因之 DNA 顺序与所有已知的小鼠 λ 轻链之氨基酸排列顺序的直接比较。基因的核苷酸顺序与 MOPC315λ_{II} 轻链的氨基酸顺序的符合程度最高。密码从疏水性领头段的第一个氨基酸 (meth.-19)开始，在 Ser.-5 起被一个 93 碱基对的基因内含子(intron)隔开，再从 Gly.-4 继续到 Phe +98，突然终止。λ_I(MOPC104E) 和 λ_{II}(MOPC315) 轻链不相同的位置用 (★) 表示，λ_I 高变异区 (HV_1, HV_2, 和 HV_3) 已知的置换用(↑)表示。加横线的氨基酸顺序受其下方的 DNA 编码，加横线的 DNA 顺序和上方至少一种蛋白的密码符合。V/C (实线) 示根据 DNA 顺序划分的 V-C 交界点，V/C (虚线)示根据所有轻链顺序划分的 V-C 交界点(据 Tonegawa 等，1978)。

细胞瘤株 κ 轻链易变区 (V_κ) 的氨基酸顺序的比较分析，以及对 V_κ 基因部分核苷酸顺序分析，均证明编码 κ 轻链的基因可分为三段，即易变区 V (残基 1—98 或 99)，连接区 "J" (残基 99 或 100—102) 和不变区 C (残基 103—219) (Weigert 等，1978)。对小鼠 λ 链基因顺序分析也发现有类似的 "J" 片段存在。比较种质系(胚胎细胞) λ 轻链基因和假定已经过重排和突变的髓细胞瘤 λ 轻链基因的核苷酸顺序，进一步发现胚胎 λ 轻

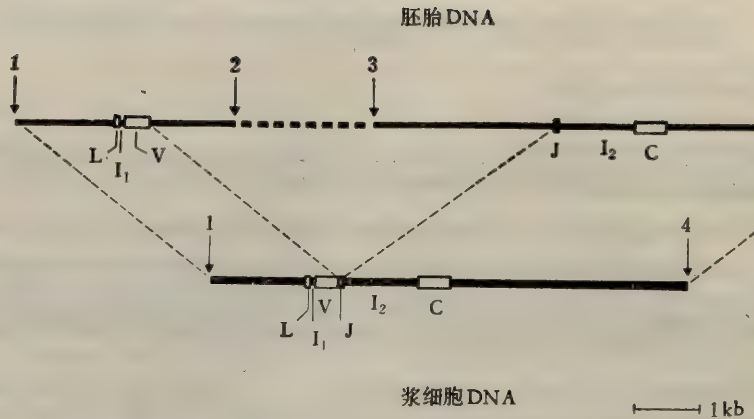


图 15-21 小鼠胚胎和产生 λ_1 链的浆细胞之 λ_1 基因的排列，示 V. J 基因片段通过移位重排（Brack 等，1978）。

链基因的 V 区又分为两个编码片段，即领头段（L）和 V_λ 段，其间相隔一个 93 碱基对的小插入顺序（I_1）；“J”基因片段和 C 基因片段之间相隔一个长达 1250 碱基对的大插入顺序（I_2）。然而，在已分化的骨髓瘤的 λ 轻链基因上，“J”基因片段和 V 基因片段直接相连（图 15-21）。这更加有力地证实了活跃的 λ 基因是由于 V 基因片段和“J”基因片段经过移位连接形成的（Brack 等，1978）。至于“J”和 C 基因片段的连接，则可能是通过转录后核内 λ 链 RNA 的剪接，加工实现的（图 15-22）（Weigert 等，1978）。因此，“J”基因片段可能同时含有连接 V，J，C 基因片段的信息，而在基因的移位重排和mRNA 的剪接中起关键作用。

对 κ 轻链重排区域 DNA 顺序分析发现有五个“J”基因片段，成串排列。比较这些“J”基因片段的核苷酸顺序，在 V 基因片段和“J”基因片段连接点附近发现一段短的廻

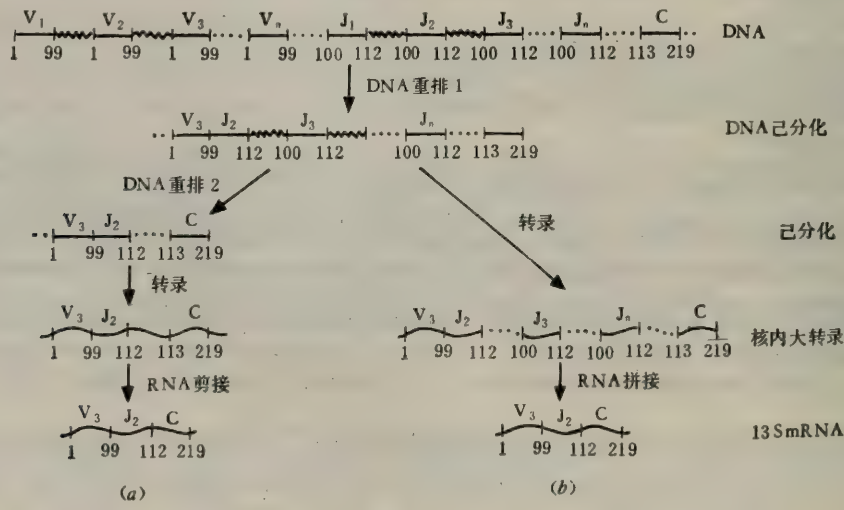


图 15-22 小鼠 κ 基因 DNA 片段的理论模型。假定在淋巴球分化过程中，各基因片段在 DNA 水平重排，并通过两种可能的途径产生 V/J 连接：（a）DNA 水平第二次重排，J_2 片段移至靠近C片段的地方，其间的 J 顺序缺失；（b）核内大的 RNA 转录本经过加工、拼接，去除插入的 J 片段（据 Weigert 等，1978）。

文顺序——CAC($^{T}_{C}$)GTC——，即在连接点两侧各存在一段反向的重复顺序。可以设想这一段廻文顺序可能形成“逆茎状构造”（“Inverted Stem Structure”），从而把 V 和“J”片段拉拢，并提供酶切和 V/J 连接的信息，体细胞水平的 DNA 重组可能就是由于切除 V 和“J”片段之间的一整段 DNA 而完成的（图 15-23）（Sakano 等，1979；Max 等，1979）。从上述事实，可以推想不同的 V 基因片段和“J”基因片段，以不同的组合方式连结，以及 V/J 连结点的任何移动，都可能在体细胞水平产生抗体的多样性（Weigert 等，1980）。这将在下一节再讲到。顺便提及，重链基因同样存在 V，J，C 分段结构（Rabbitts 等，1980a），因此可能通过同样的方式产生抗体的多样性。

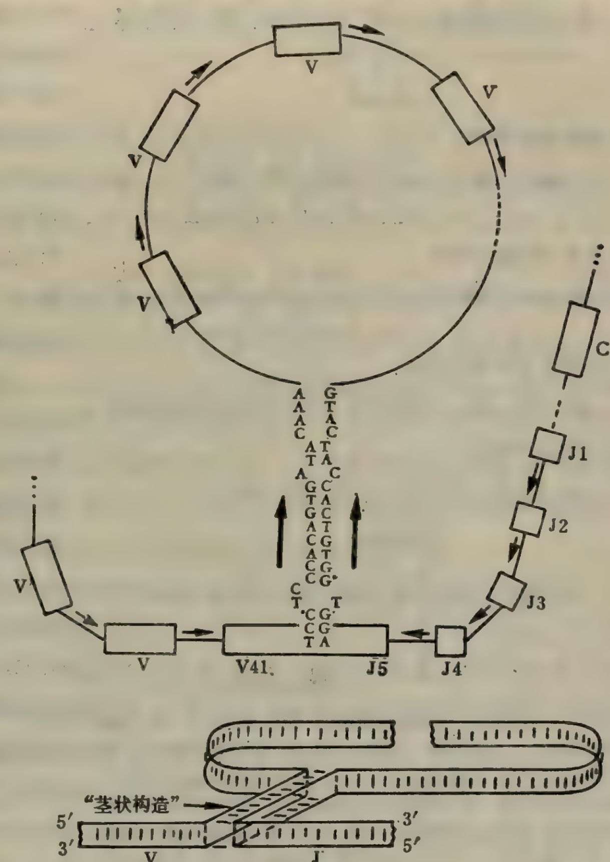


图 15-23 假定由种质系 V 和 J 基因片段附近的逆向重复顺序形成的“茎状构造”。简图上方示 κ 轻链 V、J 和 C 基因片段重排时，假定形成的过渡构造，下方示此“茎状构造”之假想的立体模型，在 V-J 连接处提供一个酶切点(据 Max 等，1979)。

总之，由于免疫球蛋白基因结构的特点，基因分隔为许多片段和存在插入顺序，通过 DNA 片段移位重排和 RNA 转录本的剪接，提供了真核生物基因进化的新方式。这种基因进化的机制在正常发育过程中也表现出来。B细胞分化过程中，重链基因的依顺序表达就是一个例子。

6. 重链基因的转换

B 细胞分化过程中，重链基因（C_H）依顺序逐次表达。在 DNA 水平，这种转换可能是由同一个 V_H 基因先和一个 C_μ 基因连接起来，共同形成一个活跃的转录单位；然后又转换为与另一个 C_H 基因(如 C_γ) 连接；继之又可转换为与另一个 C_H 基因（如 C_α）连接，如此等等。重链基因（C_H）的转换机制，假定可能通过下列几种模式进行(图 15-24)。这些模式都可以用实验加以验证，而目前的实验结果表明可能是按照缺失模式进行的。

剑桥分子生物学实验室 Rabbitts 等（1980b）用含有 $C_{\gamma 2b}$，$C_{\gamma 1}$ 等重链顺序的无性扩增的 cDNA 作为探测分子，用 Southern 吸印杂交法（Southern Blotting）来检查小鼠 γ 链各亚类（γ_{2b}, γ_{2a} 和 γ_1）基因在各种抗体分泌细胞的 DNA 上的排列。实验结果发现在分泌 IgG_{2b} 和 IgG_{2a} 的细胞中，γ_{2a} 和 γ_{2b} 基因在 DNA 上都发生过移位重排。其次，在分泌 IgG_{2b} 的细胞中，测不出 $C_{\gamma 1}$ 基因；分泌 IgG_{2a} 细胞中测不出 $C_{\gamma 2a}$

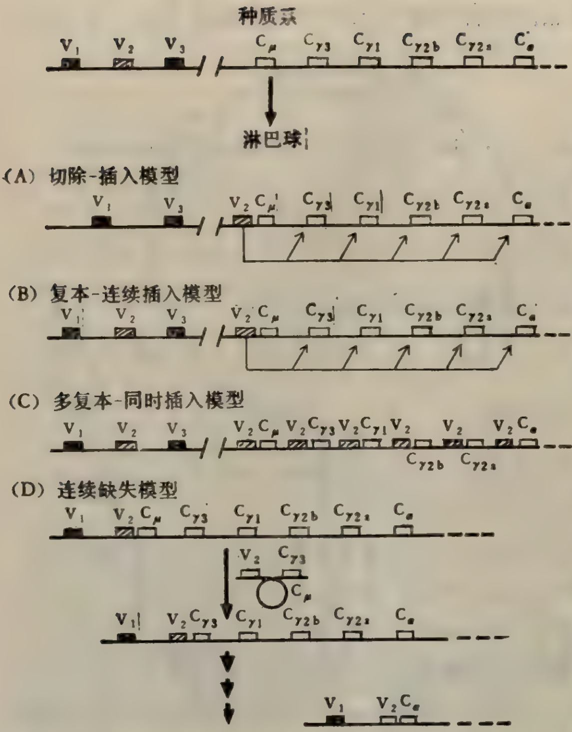


图 15-24 免疫球蛋白重链基因座内 V/C 移位和 C_H 转换之理论模型。(A)一个V_H基因从 V_H 基因库中切除下来，插入到邻近的 C_H 基因，然后再通过一系列切除和插入达到C_H转换；(B)一个 V_H 基因的复本依次插入到不同的 C_H 基因；(C)一个 V_H 基因的多个复本同时插入到所有的 C_H 基因；(D)先通过一个 V_H 基因和将要表达的 C_H 基因之间的 DNA 片段的切除而实现 V-C 连接，然后再通过 C_H 基因的连续缺失而实现 C_H 转换(据 Cory 和 Adams, 1980)。

和 $C_{\gamma_{2b}}$ 基因；而在分泌 IgA 的细胞中，则测不出 C_γ 基因 (Rabbitts 等, 1980b)。同样地，对14个表达不同类别重链的浆细胞瘤，用 Southern 吸印杂交法检查 C_μ, C_α, C_{γ_1}, $C_{\gamma_{2b}}$ 基因的数目和顺序与胚胎细胞间的异同，也得到类似的结果 (Coleclough 等, 1980; Cory 和 Adams, 1980)。这些事实支持重链 C_H 基因转换可能是按照缺失模型进行的，至少也部分与基因缺失有关。

总之，重链基因表达过程中，至少包括两次DNA水平的移位重组：一次V/J连接和一次C_H转换，即通过基因缺失而发生的 C_H 基因的依顺序表达 (Davis 等, 1980; Maki 等, 1980)。不过，也有人认为 C_δ 基因可能是一个例外。小鼠B细胞分化中，细胞表面 IgD 出现时间提示 C_δ 基因表达可能通过特殊机制，即通过 mRNA 加工过程而发生改变。最后，还应提到 B 细胞分化中，免疫球蛋白基因移位重组还支持前面提到的对等位基因互斥现象的解释 (485 页)。有人认为这一现象是由于在 B 细胞分化过程中，V/J 连接只在两条同型染色体的一条上发生，形成一个活跃的转录单位的结果 (Joho 和 Weissman, 1980)。

(二) 免疫球蛋白多样性的起源

抗体分子最显著的特点是同抗原结合的专一性，以及这种专一性的多样性。例如，一种纯系小鼠经证明能产生近 8,000 种抗 NIP 半抗原的不同的抗体分子 (Kreth 和 Williamson, 1973)。用免疫萤光法，估计合成 λ 轻链 V-区特定的个体型的浆细胞的数目，也推测人脾脏内至少存在 25,000 不同的 λ 链 V-区的细胞 (Pernis, 1967)。

对于抗体多样性的起源，虽然有各种推测，归结起来存在两种对立的假说，即种质系假说 (Germ-line hypothesis) 和体细胞突变假说 (Somatic mutation hypothesis)。简要说来，种质系假说主张编码所有免疫球蛋白的基因都包含在生殖细胞的基因组内，抗体分子的多样性是在进化过程中通过突变和选择产生的。反之，体细胞突变假说则假定抗体的多样性，至少一部分，是为数较少的种质系基因在个体发育过程中通过体细胞突变产生的。因此，体细胞突变假说所设想的 V 基因数目应比种质系假说设想的要少很多。

对于极端的种质系立场，每一类、型的重链和轻链至少要假定存在 10^3 种质系基因。为了解释 V 区亚群的存在，还要假定每一个亚群可能包括近 300 种基因复本，它们可能

起源于一个原始基因，通过大量的纵列倍增，以及缺失或插入而产生的。存在如此众多的纵列基因复本的情形下，通过不等交换造成基因大量缺失的机率显著地增高（例如 r-RNA 基因），因此还必须假定存在特殊的机制以保证 V 区基因的稳定性（Milstein 和 Munso，1973）。

对于体细胞突变假说，则假定 V 区种质系基因大约相当于 V 亚群的数目，然后在个体发育过程中通过体细胞突变增加到成体动物之全套抗体基因数目。目前这一假说遇到的严重困难是抗体个体型遗传现象的发现，如果能遗传的个体型数目很大的话，种质系 V 基因数目也要相应地扩大。

目前的一个折衷的看法是随动物种类或链的类型不同，可能存在数目多寡不等的种质系基因。例如，根据肽链一级结构和统计分析，小鼠的 κ 链至少有 50V 基因复本，λ 链至少有 25 个 V 基因复本（Cohn 等，1974）。在现有的种质系基因的基础上，淋巴细胞在受抗原刺激后的增生分化过程中，还可能通过体细胞突变产生更多的免疫球蛋白基因（Cunningham，1974；1976）。对于这几种假说的评介，有兴趣的读者可参考 Gally（1973），Cohn 等（1974），Milstein 和 Munro（1973），Williamson（1976）的综述，以及 Cunningham（1976）编辑的《抗体多样性起源》专集，这里不能详述。

过去对于上述两种假说的检验，只能根据间接的实验证据（主要是重链和轻链的一级结构资料）以及分子遗传和进化一般原理进行理论上的探讨。然而，问题的关键在于直接测定种质系细胞和浆细胞基因组内，V 基因数目是否不同。真核细胞基因组虽然无比复杂，由于分子遗传学和遗传工程技术的进步已开辟了直接分析这一问题的可能性。目前，已有人利用同位素标记的重链（或轻链）mRNA 或 cDNA 作为探测分子，通过分子杂交技术来估计免疫球蛋白基因的数目。（Tonegawa 等，1974；Tonegawa 和 Steinberg，1976；Tonegawa 和 Hozumi，1976；Rabbits 和 Milstein，1977 Honjo 等，1976）。现将最近取得的主要结果简述如下：

1. 种质系免疫球蛋白基因数目——核酸分子杂交

瑞士巴塞尔免疫研究所 Tonegawa 实验室采用 RNA-DNA 杂交技术来研究抗体多样性起源问题。为了方便起见，需要先简单介绍一下这一技术的原理（参看 Melli 等，1971；Bishop，1972）。

当双链 DNA 变性后，在有放射性标记 RNA 存在时，在退火过程中那些同 DNA 含有互补顺序的 RNA 分子就可能形成 DNA-RNA 杂交分子。杂交的 RNA 分子不被 RNAse 酶破坏，易于分离和测量。在一定退火条件下，产生的杂交 RNA 的比值（f）依赖于 RNA 浓度（R_o），DNA 浓度（C_o）和温育时间（t）。如 DNA 过量时，f 不依赖 R_0，而只依赖 Cot 乘积。这一原理虽似简单，但用于真核生物非重复（单复本）基因测量时，在条件上要求相当高。当 DNA 和 RNA 比值太小于 10^7 时，便不能测出单复本基因。因此，对 RNA 碘标记的比强度要求相当高。

根据已有的 Balb/c 小鼠 λ 轻链氨基酸排列顺序的资料，18 条 λ 链中有 12 条有相同的顺序（λ_1 型），其余 6 条则各不相同，和 λ_1 链在高变异区有 1—3 氨基酸（相当于 1—4 个碱基）的置换（Cohn 等，1974）（图 15-25）。因此，这些编码 V_λ 基因的核苷酸顺序之间假定应存在广泛的同源性。如果种质系假说是对的，则小鼠单倍基因组内应至

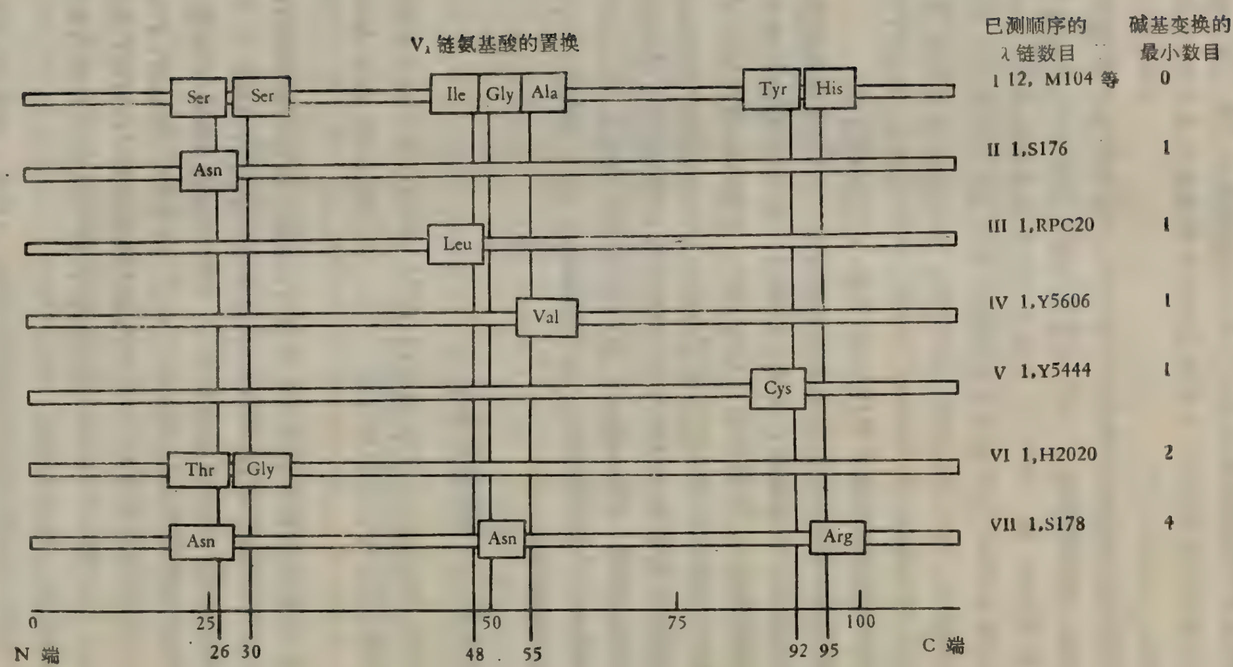


图 15-25　小鼠λ轻链排列顺序的差异的比较(据 Cohn 等，1974)。

少含有 7 个不同的 V_{λ} 基因。一个编码 λ_1 链的mRNA将能同所有这些基因杂交。因此，Cot 曲线应指示每单倍基因组内应有7个复本。反之，按照体细胞突变假说，如果 λ_{II} 到 λ_{VII} 顺序是由 λ_1 通过体细胞突变过程产生的，则 Cot 曲线将指示每单倍基因组内只有单个复本。实际上，Balb/c小鼠 V_{λ} 链的数目远超过 7，据统计分析至少有 25 个以上。

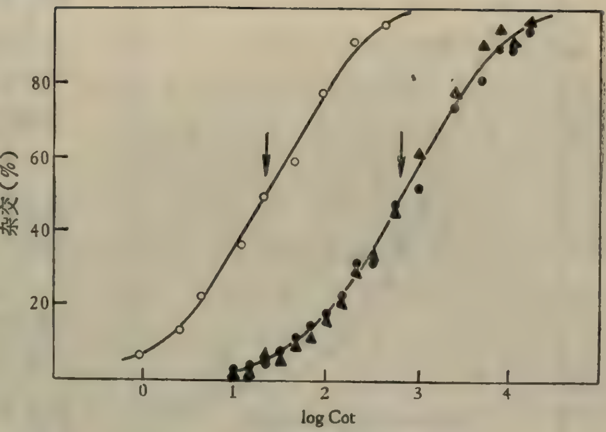


图 15-26 小鼠碘标记几种 RNA 同小鼠肝 DNA 的杂交。(●) M-104Eλ 轻链 mRNA；(▲) α，β 珠蛋白 mRNA；(○) 18SrRNA 箭头指 $Cot_{1/2}$ 值(据 Tonegawa 和 Steinberg，1976)。

Tonegawa 等制备了高比强碘标记的 MOPC-104E λ 链 mRNA（纯度 90% 以上)，使同小鼠肝脏 DNA （非淋巴组织，可代表种质系基因组）杂交。从图 15-26 所示结果可见，$Cot_{1/2}$ 值表明 V_{λ} 基因重复频率 (Reiteration frequeney) 为 2—3。此外，从图上还可看到，λmRNA 和小鼠珠蛋白 mRNA 的 Cot 曲线几乎是重合的。根据从前的测定，已知小鼠珠蛋白基因重复频率不超过 3。18S rRNA 的 Cot 曲线指示的基因重复频率约为 200，也是同过去文献数据一致的。所有这些都表明实验结果是可信的。因此，这些结果表明能和 MOPC-104E λ 链 mRNA 杂交的种质系基因数目在每一单倍基因组内不会超过几个。

剩下的问题是验证编码各种 λ 链 mRNA 之间碱基顺序存在广泛同源性的上述假定。为此又进行了 HOPC-2020 λ 链 mRNA 和 M104E λ 链 mRNA 之间的竞争杂交实验，这两种 λ 链只有两个氨基酸的差异(见图 15-25)。从图 15-27 的结果可见，异源的 (HOPC-2020) λ 链 mRNA 分子和同源的 (M104-E) λ 链 mRNA 分子位于同一条曲线上。因此，可以作出结论编码这两条 λ 链 V 区的核苷酸顺序彼此可以和同一基因交叉杂交，因而是很相似的。同理，可以类推到其他存在氨基酸顺序广泛同源性的 λ 链。因此，从上述核酸杂交测定的结果可以得出结论，种质系基因数目太少，不足以说明已观察到的小鼠 λ 链的多样性(或许至少有 25 条)(Tonegawa 和 Steinberg，1976；Tonegawa，1976)。

英国剑桥分子生物学实验室利用小鼠几种浆细胞瘤 (MOPC21，MOPC321，MOPC41) 的各种 C_{κ}mRNA 的 cDNA 复本进行的杂交实验证明每单倍基因组内只存在 1—5 基因复本。同样地，所测到的 V_{κ} 基因重复频率也是同上述 C_{κ} 基因的结果相似的 (Rabbits 和 Milstein，1977；Milstein 等，1975；1976)。此外，美国国立卫生研究院 Leder 实验室利用从 RPC-20 浆细胞瘤 λ 链 mRNA 制备的 cDNA 作为探测分子，进行的核酸杂交实验同样证明在产生 κ 或 λ 链的瘤细胞或正常组织的 DNA 中，每单倍基因组内只含有大约两个基因复本 (Honjo 等，1976)。

总之，从几个实验室的结果看来，V_{λ} 和 V_{κ} 基因的重复数目可能是很有限的。因此，没有理由相信，这些基因的总数比根据蛋白质顺序测定得出的亚群的总数更多。这些结果似乎排斥了每一种 λ 或 κ 链变异型都存在相对应的种质系基因的可能性。或者

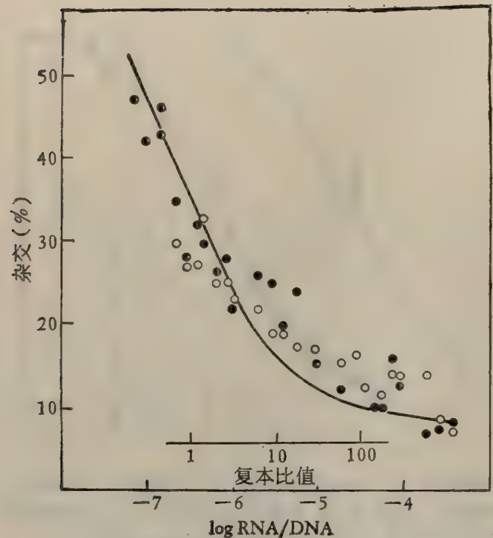


图 15-27 碘标记 M-104EλmRNA 和未标记 mRNAs 之杂交竞争实验。(○) M104-EλmRNA; (●) H-2020 λmRNA (据 Tonegawa 和 Steinberg, 1976)。

说，种质系基因的总数太少，不足以解释 λ 链和 κ 链的多样性(如前述，根据氨基酸顺序和统计分析资料，V_λ 区至少有 25 种不同的顺序)。

最近，Leder 实验室对小鼠胚胎和产生 κ 链的瘤细胞之免疫球蛋白基因构造的初步分析却得出不同的结论 (Seideman 等，1978b; 1978c)。他们从小鼠 MOPC-149 骨髓瘤 DNA 中，鉴定出至少 6 个编码 κ 链 V 区基因顺序的 EcoRI 酶解片段。将其中两个 DNA 片段制备成无性繁殖 DNA，并测定其 V 区基因的全部核苷酸排列顺序。结果发现这两个基因在 1 至 97 密码位置的排列顺序是很相似的，但是它们在高变异区以及少数恒定区域同根据 MOPC-149细胞之 κ 链推导出的核苷酸顺序有少数差异，它们两者彼此之间的顺序同样也有少数差异。因此，抗体形成细胞除可能含有其表型上表现的基因的顺序(κ 链)外，还可能存在几个密切相关而又略有差别的基因顺序，它们属于同一个亚群。据此类推，小鼠 κ 轻链的许多亚群，其中每一个亚群也可能含有类似的一组基因，于是小鼠种殖系基因库内可能存在足够多的 V 基因(200—1000) 来编码多种多样的 κ 链。此外，这两个来自同一亚群的无性繁殖 V 基因片段的结构特点是在结构基因的两侧都存在广泛的同源区域(包括几千碱基对)。这就提供了顺序相似的基因之间通过不均等交换等方式进行重组，并产生变异的机会(Seidman等，1798c)。

另一方面，Hood 实验室根据对小鼠三个 V_κ 亚群 DNA 部分顺序的研究，认为每一亚群可能存在 4—8个种质系基因。由此推测整个 V_κ 基因库约包含 350 个种质系基因。反之，小鼠 V_λ 基因数目很少，可能只有一，二个种质系基因 (Weigert 等，1978)。

同样地，分子杂交结果提示人和小鼠 DNA 内所含有的重链 V_{HIII} 亚族的基因数目也不太多，此两物种 V_H 基因总数估计约在 40～80 之间 (Rabbits 等，1980)。

总之，虽然不同作者估计的 V基因数目有些差别，目前得到的一般结论是种质系基因组内，V基因总数是有限的，大致相当于或十数倍于根据蛋白质一级结构测定得到的轻链或重链亚群的数目。因此，种质系V基因数目太少，不足以解释 λ 链或 κ 链V区的多样性。

根据这些结论，有人提出种质系 V 基因数目和免疫球蛋白肽链变异型数目之间的差距是通过发育过程中淋巴细胞的突变填补起来的。

核酸分子杂交实验结果似乎支持体细胞突变假说，而不支持种质系假说。然而，V 基因数目究竟有多少，分子杂交并不能给予肯定的回答，还有待于对基因组的直接分析。如前节所述，这方面的工作已经开始进行了。

2. 体细胞突变的方式

真核生物的体细胞突变常被看作是抗体多样性起源的原因。然而，关于哺乳类体细

胞突变的方式在分子水平的知识还很少。

Milstein 实验室研究了小鼠骨髓瘤 MOPC-21 细胞株之变异细胞群，并确定了免疫球蛋白 γ 重链的一系列自发的变异型。他们分离了自发的变异细胞群，并系统地分析了所产生的蛋白质和 mRNA 的酶解图谱，以及分离的 mRNA 在无细胞系统内的翻译情况。通过多方面的研究，鉴定了四种有自发的构造变异的免疫球蛋白分子，称为 IF_1，IF_2，IF_3 和 IF_4。这些突变分子的主要特点是，IF_1，IF_2 和 IF_3 的重链都有特定的功能区的缺失，如 IF_1 和 IF_3 之 C_H^3 功能区的大部分缺失。IF_1 在氨基酸 358 残基位置发生一个"无意义"突变，导致转录的过早终止。IF_3 在 341 残基位置出现 2 个碱基的缺失，引起移码突变，结果在畸变顺序的 354 残基位置过早出现终止密码。IF_2 是由于发生在 C-V交界处的缺失，失去 C_H^1 功能区。同时，这一事实也有力地说明了，在这些发生突变的细胞内，V、C基因可能是整合在一起的。IF_4 突变分子则包括一个无意义突变，碱基 G 代替了 A，相应地在415残基位置的门冬酰氨变成了门冬氨酸。这些研究结果肯定了过去仅在原核生物和酶母细胞上证实的突变事件也同样能在真核生物体细胞上发生(Cotton等，1973)。

另外，有人发现离体培养的小鼠 S107 浆细胞瘤株分泌的抗体经常自发地发生结合专一性的变化 (Cook 和 Scharff, 1977; Scharff 等, 1976)。这些例子都提示在培养条件下，可能通过体细胞突变产生抗体的多样性。不过，这一现象在多大程度上能代表免疫系统正常发育过程中抗体多样性的起源的真实情况，还不能肯定，需要进一步研究。

迄今关于抗体多样性起源的假说都是假定当动物达到成年时，已获得全套抗体专一性，表现在免疫活性细胞表面受体的多样性。然而，也有证据表明抗体的多样性是在免疫活性细胞接受专一的抗原刺激后，细胞增生过程中，发生随机突变而产生的。或者说，成体动物抗体的多样性仍然是有限的。当其中一种专一性的受体，受到抗原刺激时，在细胞扩增过程中，细胞表型由于随机突变而出现大量的专一性。抗原则选择其中最相适应的一种专一性 (Cunningham 和 Fordham, 1974; Cunningham, 1966)。这是又一个尚待深入研究的问题。

3. 抗体多样性起源的机制

根据对免疫球蛋白基因结构的知识，假定抗体多样性起源可能存在四种主要机制：

(1) 许多个种质系 V 基因

这是指在抗体分子进化过程中产生，并保留在生殖细胞内的 V 基因。其数目随动物种类或链的类型而有不同。对小鼠 V_κ 基因顺序分析结果表明，每一 V_κ 亚群可能有4—8 个种质系基因，因而 V_κ 总计应约有 350 种质系基因 (Weigert 等, 1978)。对重链 V 区基因类似地估计，至少可能有 200 个种质系 V_H 基因 (Rabbitts 等, 1980)。小鼠 V_λ 基因数目很少，可能只存在 1 或 2 个种质系 V_λ 基因。

(2) H 链和 L 链的随机组合

不同的重链和轻链可以自由地随机组合，形成结合专一性不同的抗体分子。虽然这是一个非遗传的机制，但也可能是抗体多样性的一个来源。如上述，种质系V基因库内，V_H约为 200，V_L 约为 350，则 $V_H \times V_L$ 能产生$\sim 7\times10^4$ 不同的抗体分子。如果假定哺乳动

物抗体分子总数超过 10^6，则 90% 种类的抗体应起源于体细胞变异机制。

(3) 体细胞突变

这可能发生在 B 淋巴细胞分化过程中，或与抗原接触后的增生过程中。对小鼠 $V_{\kappa 21}$ 的顺序分析结果表明所有亚群内氨基酸残基的置换主要发生在高变异区，并且都是单个碱基置换的结果。显然，这些可能起源于自发的体细胞突变。

(4) 重组连接 (Combinatorial joining)

如前节所述，κ，λ 和 H 链的基因结构中，均存在许多个“J”基因片段。基因移位重排过程中，不同的 V 片段和“J”片段的连接，以及这种连接点的任何移动，通过“移框”，都可能产生抗体的多样性。

总之，抗体多样性可能通过多种机制产生。一些机制是遗传的(多个 V 基因，重组连接和体细胞突变)，另一些是非遗传的 (V_L，V_H 随机组合)。至于这四种主要机制在产生抗体多样性中，各自起多大的作用，还是一个未解决的问题。

总的说来，抗体多样性起源及其遗传控制是现代免疫学中一个非常复杂的问题。关于种质系 V 基因的数目，体细胞突变的产生机制等关键问题的研究，目前已取得相当的进展，但仍未解决。核酸分子杂交实验虽有较多证据支持体细胞突变假说，但是对免疫球蛋白基因结构的初步分析似乎又得出不同的看法。不过，有一点是可以肯定的，解决这一难题的正确道路应当是对于 B 淋巴细胞的基因组及免疫球蛋白基因构造进行深入的实验分析，而不是理论上的臆测。

三、免疫反应的遗传控制

免疫反应是一个需要 T，B 淋巴球和巨噬细胞参加的复杂过程。这一过程除包括对抗抗原的专一的识别外，还包括这些细胞相互之间的识别及其相互作用，其中每一步骤都可能受基因控制。近年来已经证明存在许多控制免疫反应的量和专一性的基因，总称为免疫反应基因 (Immunoresponsive genes，简称 Ir 基因)。免疫反应基因的作用方式可能各有不同，有的控制抗原的处理，因而非专一地影响抗体反应的总水平。另一些免疫反应基因则影响对专一抗原的反应，它们又可分为两类。一类是和免疫球蛋白同种异型连锁的；另一类是和主组织相容性基因复合物连锁的 (H-连锁的 Ir 基因)。 前者可能代表可遗传的个体型的 V 基因，并可能编码 B 细胞表面的抗原受体。后者可能主要和 T 细胞表面抗原受体以及 T，B 细胞和巨噬细胞相互之间的识别系统有关系。本节主要讨论 H-连锁的 Ir 基因，特别是其基因产物和 T 细胞抗原受体，以及免疫活性细胞相互识别系统在结构和功能上的关系。

(一) 组织相容性连锁的免疫反应基因

目前已证明豚鼠、小鼠、大鼠和家兔等动物对特定抗原的专一的反应能力是受与组织相容性连锁的基因控制的，这些基因是位于常染色体上的显性基因，并严格地按孟德尔方

式遗传。

1. Ir 基因和免疫反应的遗传控制

专一的 Ir 基因主要是在研究纯系动物对一些化学构造上比较均一的抗原，如合成的多聚氨基酸，包括多聚-L-赖氨酸 (PLL)，(T,G)-A—L 和 (Phe,G)-A—L，以及同种异型抗原(如同种异型免疫球蛋白)时发现的。

早期研究发现不同的纯系动物对这些抗原的反应能力不同。有些纯系对这些抗原有反应能力，称为反应者 (Responder)；另一些纯系则无反应能力，称为非反应者 (non-responder)。并且，这些对专一抗原的反应性是可以遗传的。例如，豚鼠品系 2 对 PLL 和 GA 有反应能力，而品系 13则无反应。对于抗原 GT，情况则正好相反。同样地，小鼠各种纯系按其 H-2 单元型的不同，对合成多肽抗原的反应也有显著的不同(表 15-7)。

表 15-7 不同纯系的小鼠对抗原的反应能力和 H-2 单元型的关系

抗　原	H-2　单　元　型					
	H-2ª	H-2ᵈ	H-2ᵏ	H-2ᑫ	H-2ᵇ	H-2ˢ
(a) 合成多肽						
(T, G)-A--L	−	−	−	−	+	−
(Phe, G)-A—L	+	+	+	+	+	−
(H, G)-A--L	+	−	+	−	−	−
(b) 同种异型抗原						
IgA	+	−	+	−	−	+
IgG	−	−	−	−	+	+

＋ 示高反应者，－ 示低反应者。

McDevitt 和 Chinitz (1969) 最先证明小鼠对 (T,G)-A—L，(Phe,G)-A—L，和 (H,G)-A—L 的反应和 H-2 类型有密切的关系。他们发现 Ir 基因是位于常染色体上的显性基因，因为高反应性的和低反应性的小鼠杂交子代 F_1 具有高反应性特征。并且，当 F_1 子代和亲代小鼠反交时，高反应性和低反应性随一定的 H-2 型分离，证明这些基因是同 H-2 基因座连锁的。后来，还将控制对 (T,G)-A—L 反应能力的 Ir 基因定位于 H-2 复合物之 K 区和 S 区之间的一个新区域，称为 I 区 (McDevitt 等，1972)。

H-2 连锁的 Ir 基因只和依赖胸腺抗原(如蛋白质和多肽)的反应性有关系，并且同专一的迟发型超敏反应 (DTH) 和 T 辅助细胞活动有关系。此外，还证明 Ir 基因主要控制专一的载体的识别过程，而和免疫球蛋白 V 区的遗传控制没有关系 (Benacerraf 和 McDevitt，1972)。因此，Ir 基因及其分子产物具有抗原专一的作用，并且主要是和依赖胸腺抗原的免疫反应的调节有关系的。

2. H-2 连锁的 Is 基因和专一免疫抑制的遗传控制

免疫反应的诱导过程中，抑制 T 细胞之负调节作用发现后 (Gershon，1974)，自然提出一个问题，即这种抗原专一的负调节作用是否也同样受 I 区基因的控制?实验研究证明确系如此。对 Glu^{60}, Ala^{30}, Tyr^{10} (GAT) 共聚物无反应性的动物，当 GAT 加上有免疫原性的载体 MBSA 时，便能产生对 GAT 的抗体反应。但是，如果事先用 GAT 免

疫，后来对 GAT-MBSA 的抗体反应，便被专一地抑制了。并且，还证明这种抑制作用是由于产生了专一的抑制 T 细胞的结果（Kapp 等，1974a,b）。 对 Glu^{50} Tyr^{50} (GT) 共聚物的反应也存在同样的情况，GT 预先免疫同样能抑制后来对 GT-MBSA 的抗体反应。 对 GT 系统进一步研究还证明，GT 予先免疫抑制对 GT-MBSA 的抗体反应只在具有某些 H-2 单元型（$H\text{-}2^k$，$H\text{-}2^d$，$H\text{-}2^s$）的纯系小鼠发生，而不能在另一些 H-2 单元型（$H\text{-}2^b$,$H\text{-}2^a$）发生。同时，还证明产生 GT 专一抑制的能力是受一个显性基因控制的，因为抑制和非抑制品系杂交子代 F_1 对 GT 的反应是能够产生抑制 T 细胞（Debré 等，1975）。GT 专一的免疫抑制基因（Is）同样位于 H-2 复合物的 I 区（Debré 等，1976）。

总之，胸腺依赖抗原的免疫反应的重要特点是严格地受和 MHC 联锁的一群基因控制，这些基因的调节作用不仅限于正调节，而且也能调节专一的抑制反应。换句话说，抑制 T 细胞和辅助 T 细胞的抗原专一的功能活动都受 H-2 基因复合物 I 区的控制。至于控制这两类 T 细胞的基因之间的关系如何，目前还不清楚（Paul 和 Benacerraf，1977；Benacerraf 和 Germain，1978）。

（二）主组织相容性基因复合物和 I 区

人和小鼠等哺乳动物染色体上同控制异体组织和器官移植有主要关系的遗传区域，包括同移植组织的排斥，移植物抗寄主反应，混合淋巴细胞反应，以及其他有 T 细胞参加的免疫学现象有关的紧密连锁的一群基因，称为主组织相容性基因复合物(Major Histocompatibility Compbx，简称为 MHC)。 这一基因复合物在所有已经研究过的哺乳类动物上都存在。在人类称为 HLA 系统，在小鼠称为 H-2 系统。由于 H-2 基因复合物的精细构造研究得最深入（Klein，1975），免疫反应基因的功能和定位的工作也主要是在这一系统上进行的。

1. H-2基因复合物的基本构造

小鼠 H-2 基因复合物位于第 9 连锁群（17 号染色体）上。单个染色体上携带的 H-2 基因，称为 H-2 单倍型（Haplotype）。 利用不同 H-2 单倍型的纯系之间免疫产生的同种异型抗体和一组标准的动物（包括纯系和已知同种异型状态的纯系的重组体），通过细致地交配实验和血清学分析，便可以作出 H-2 基因复合物的基因图，主要是由 K，I，S，

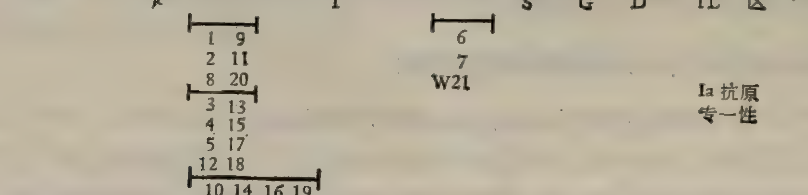


图 15-28 小鼠 H-2 基因复合物及免疫反应基因图（据 Tachibana，1977）。

表 15-8 主组织相容性基因复合物各区的免疫学功能

MHC 的功能	H-2 区
1. 抗原刺激的移植物排斥和专一的T杀伤细胞	K和D>I
2. 对细胞膜抗原专一的T杀伤细胞：病毒抗原，肿瘤相关抗原，或次要的组织相容性抗原	K和D
3. 混合淋巴细胞反应；移植物抗寄主反应。	I>K 和D
4. 对胸腺依赖抗原的专一的免疫反应（Ir 基因）	I(I-A, I-B, I-C)
5. T细胞的专一免疫抑制，免疫抑制基因（Is 基因）	I
6. 抑制T细胞或抑制因子的 Ia 抗原专一性	I-J
7. IgG 次级反应中T和B细胞协同作用	I-A
8. 巨噬细胞对T细胞提供抗原，对胸腺依赖抗原的次级抗体反应，迟发型超敏反应	I-A
9. 补体成分：C4, C2 和 C3；B 因子。	S及 MHC 以外的基因座

（据 Paul 和 Benacerraf, 1977）。

G, D 五个区域构成的（图 15-28）。各区域控制的主要免疫学功能列于表 15-8（Schreffler 和 David, 1975；Paul 和 Benacerraf, 1977）。现将几个区的主要功能简述如下：

（1）K和D区

包含编码主组织相容性抗原（H-2K, H-2D 抗原）的基因。其产物分布在体内大多数细胞的表面，为膜上的糖蛋白，在移植物的排斥反应中起主要作用，它们是同种异体反应的 T 杀伤细胞的主要攻击目标（参看第四章，132页）。

（2）S 区（Ss-Slp区）

控制血清内与补体有关的 β 球蛋白的水平（Demant 等，1973）。这一区域的标记基因，Ss 基因，已经证明是 C4 的结构基因（Lachmann 等，1975）。

（3）I 区

位于 K 和 D 区之间，控制对胸腺依赖抗原的免疫反应的一群紧密连锁的基因。I 区又可以细分为 I-A, I-B, I-J, I-E, I-C 等五个亚区。

考虑到 T 细胞的主要功能是识别同一物种（或其他物种）MHC 基因产物并和它们起反应，因此同 MHC 连锁的 Ir 基因控制对胸腺依赖抗原的免疫反应并位于 MHC 区域内，应有更深一层的意义，可能启示整个 MHC 系统各区在进化上和功能上的联系。

2. I-区的构造和功能

如上述，小鼠 I 区是 17 号染色体上 H-2 复合物之 K 区和 D 区间的一段（Schreffler 和 David, 1975）。它原先是代表控制专一免疫反应的基因所在的遗传区域。后来发现编码刺激混合淋巴细胞反应（MLR）的抗原的基因也位于这一区域。

利用几种不同的研究方法来分析 I 区的构造和功能，并将它划分为几个亚区。这些方面的研究结果简述如下（表 15-9）：

1. 免疫反应基因的定位

根据对各种抗原反应性的 Ir 基因控制可将 I 区再分为 I-A，I-B 和 I-C 亚区 (McDevitt 等，1972)。 大多数 Ir 基因 [如控制 (T,G)-A—L 等抗原的 Ir 基因] 定位于 I-A 亚区。少数需要互补 Ir 基因的抗原的基因，位于 I-B 和 I-C 亚区(图 15-29)。

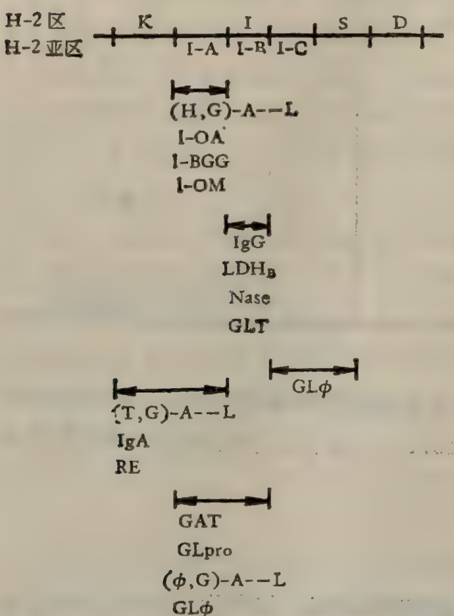


图 15-29 小鼠 H-2 基因复合物 I 区内几个 Ir 基因的定位(据 Benacerraf 和 Katz，1975)。

2. Ia 抗原专一性的定位

在发现 Ir 基因后，有人用除 I-区有差异外，其余遗传背景都相同的小鼠的淋巴球彼此交叉免疫。利用这样得到的抗血清就可以鉴别 I 区各亚区的基因产物，每一个亚区和特定的抗原决定簇有关系。这些抗原决定簇主要位于 B 细胞上 (McDevitt 等，1974)，后来在巨噬细胞和 T 细胞上也发现存在 (Hämmerling 等，1975；David 等，1976)；总称为 Ia 抗原。用血清学方法还发现一个新的 I-J 亚区，它编码抑制 T 细胞的表面抗原 (Murphy 等，1976)。 此外，I-J 亚区还编码抑制 T 细胞因子 (Tada 等，1976；Greene 等，1977)，而 I-A 亚区编码辅助 T 细胞因子 (Taussig 等，1976；Mozes，1976)。

Ir 基因和 Ia 抗原专一性定位于 Ir 基因图谱的同一亚区内，它们之间的关系如何呢？T 和 B 细胞以及巨噬细胞表面的 Ia 抗原分子是否就是 Ir 基因产物本身或仅仅同它们相关连呢？最近的研究结果表明豚鼠和小鼠的 Ia 抗原专一性同 Ir 基因控制的免疫反应之间存在非常密切的相关性。 如豚鼠纯系 13 之 Ia-1 和 Ir-GT 基因之间；Ia-3 和 Ir-DNP-GPA 基因之间；豚鼠纯系 2 之 Ia-2 同 Ir-DNP-GL 基之间；以及小鼠 Ia-7 (I-C) 和 Ir-GL$\phi\alpha^+$ 基因之间都存在明确的相关性 (Benacerraf 和 Dorf，1976)。并且，抗 Ia 决定簇的同种异体抗血清能抑制受 Ir 基因控制的抗原在离体条件下的免疫反应 (Schwartz 等，1976)。 这些结果都表明 Ia 抗原专一性和 Ir 基因控制的免疫反应存在密切的关连。至于 Ia 抗原分子是否就是 Ir 基因产物本身则还不能肯定，还有待于对 Ia 分子的化学构造和免疫学功能的进一步研究。

3. Ia 抗原分子的化学构造

利用专一的抗 Ia 同种异体抗血清可以分离 ^{125}I 标记的脾脏细胞表面的 Ia 分子，鉴别其种类和化学构造 (Cullen 等，1974)。 结果在小鼠发现两种 Ia 分子，一种是 I-A 亚区编码的，另一种是 I-C 亚区编码的。 I-A 亚区编码的 Ia 分子是一个糖蛋白，由 25,000 和 33,000 道尔顿的两条肽链构成 (Cullen 等，1976)。 I-B 亚区和 I-J 亚区还没有找到相应的 Ia 分子。 Ia 分子的构造以及它们在免疫活性细胞的相互识别和相互

表 15-9 小鼠 I 区的性质

I 区的性质	I 亚区			
	I-A	I-B	I-J	I-C
(a) 功能				
Ir 基因	+	+	−	+
Is 基因	(+)		−	(+)
MLR	+		+	+
移植物排斥	+		−	+
细胞相互作用				
巨噬细胞-T 细胞	+	−	−	(+)
T 细胞-B 细胞	+	−	−	(+)
抑制 T 细胞	−	−	+	(−)
DTH 传递	+	−	−	(−)
(b) 血清学				
Ia 专一性				
B 细胞	+	−	−	+
巨噬细胞	+	−		(+)
抑制 T 细胞	−	−	+	−
辅助 T 细胞	(+)	−	−	−
因子				
T 细胞抑制因子	−	−	+	−
T 细胞辅助因子	(+)	−	−	−
(c) 化学				
用专一的同种异型抗血清分离 Ia 分子	+	−	−	+

(+) 假定存在或在特殊情况下存在，(−) 在有互补 Ir 基因对照条件下测不出抗原。
(据 Benacerraf 和 Germain, 1978)。

作用中的作用是需要进一步弄清楚的重要课题。

(三) I 区基因产物和免疫活性细胞间的相互作用

与 MHC 连锁的 Ir 基因的发现促进了对体液免疫和细胞免疫的调节机制的研究。已知 T 淋巴球在免疫反应的调节中起主导作用。Ir 基因产物以及 Ia 抗原不仅在 B 细胞和巨噬细胞表面表现出来，而且也在各类 T 细胞表面表现出来，同抗原一起决定着免疫反应中细胞相互识别和相互作用的专一性。

有证据表明 T 淋巴球对胸腺依赖抗原的识别同时还依赖对位于细胞表面的 MHC 产物的识别。巨噬细胞，T 细胞和 B 细胞的相互作用中，要求参加初级反应的巨噬细胞或 B 细胞同参加次级反应的巨噬细胞或 B 细胞位于细胞表面的 I-区产物具有相同的性质。也就是说免疫反应中，细胞之间的相互作用要受抗原专一性和 MHC 产物专一性的双重限制 (Miller 等, 1975; Katz 和 Benacerraf, 1975)。各亚群的 T 淋巴球(辅促细胞或抑制细胞)对免疫反应的调节不只限于正调节或负调节作用，而且还能和抗原一道选择具有特定功能表型(如合成特定类别、亚类和同种异型的免疫球蛋白) 的 B 前体细胞。有证据表明成体脾脏内至少存在两个 B 细胞亚群。大的亚群细胞表面有 Ia 决定簇，小的亚群则没有。当用专一的抗 Ia 血清和补体破坏带 Ia 抗原的 B 细胞亚群时，则

对胸腺依赖抗原的离体的 IgG 反应就被破坏，而 IgM 反应则很少受到影响（Press 等，1976）。这提示分泌 IgG 的 B 前体细胞表面的 Ia 分子可能是和 T 辅助细胞及抗原相互作用的地方，并且可能同从合成 IgM 到合成 IgG 的转换机制有关系。其次，也有实验表明与 IgE 抗体反应和 IgG/IgM 抗体反应有关的载体专一的 T 辅助细胞是不相同的（Kishimoto 和 Ishizaka，1973）。此外，T 辅助细胞还可能参与对分泌高亲合力抗体的细胞株的选择（Gershon 和 Paul，1971）。从 T 细胞的这些十分专一的调节功能看来，T 细胞应能严格地识别一定类别、亚类、同种异型或个体型的 B 前体细胞表面的专一记号。这些专一的表面记号可能是 B 前体细胞表面的 Ig 分子本身（Fc 或 V 区的个体型决定簇）或 Ia 决定簇。这就是说 B 细胞表面的 Ia 抗原可能作为 T 细胞调节因子的接受分子。Taussig 和 Munro（1975）的实验提示 I-区可能存在编码 T 细胞和 B 细胞表面识别分子的结构基因。一个基因控制 T 细胞对抗原的识别和产生 T 细胞调节因子；另一个基因则控制产生 B 细胞表面的 T 细胞调节因子的接受分子。这些 I 区基因产物不仅可能和抗原识别有关系，而且可能和 T、B 细胞，以及巨噬细胞间的识别有关系。也就是说 I-区基因产物不仅同 T 细胞的抗原受体有关系，而且同免疫活性细胞之间相互识别系统也可能有关系（参看图 13-10，408页）。可进一步设想，不同亚群的 T 细胞表面存在由I 区不同功能的基因编码的识别分子或产生不同功能的调节因子（如 T 抑制因子受I-J亚区编码，T 辅助因子受 I-A 亚区编码），因而能选择地识别具有不同的表面标记（Ia 抗原决定簇）的免疫活性细胞并和它们相互作用，由此调节免疫反应的类型。这种对抗原专一性和 Ia 专一性的双重识别，保证了这种包括复杂的细胞相互作用的免疫调节机制的精确性和灵活性。

总之，T 细胞（及其亚群）主要有三方面的识别功能：

1）识别 MHC 之 H-2K 和 H-2D 的基因产物并与之反应——T 杀伤细胞；

2）识别 I-区产物（Ia 决定簇）；

3）识别胸腺依赖抗原。

与 MHC 连锁的 Ir 基因的发现使有可能把 T 细胞这几方面的功能在共同的遗传基础上统一起来。T 细胞的主要功能是识别 MHC 基因复合物编码的细胞表面抗原，包括 H-2D 和 H-2K，以及 Ia 抗原。它们通过对细胞表面主组织相容性抗原的变异的识别（区别自我和非自我）而担负起对外源细胞和突变细胞的排斥作用；另一方面，通过对免疫活性细胞表面 Ia 抗原决定簇的识别又在抗原专一刺激引起的免疫系统细胞相互作用中起调节作用。在这一过程中，T 调节细胞像同抗原专一地相互作用一样同免疫活性细胞专一地相互作用。至于 T 淋巴球的抗原受体（识别分子）的性质，甚至上述三种识别功能是由几个分子担任，还是一个分子复合物同时识别 Ia 抗原和依赖胸腺抗原都还不清楚。不过，目前一般认为 T 淋巴球不合成 Ig，也没有可鉴别出的 κ、λ 轻链。然而，有证据表明 T 淋巴球抗原受体具有和抗同一抗原决定簇的抗体重链相同的个体型决定簇。因此，有人假定 Ig 重链 V 区可能是 T 淋巴球受体的一部分或受体之一（参看第十三章，408页）。最近，对 T 调节因子的研究发现这种分子（或分子复合物）同时具有专一的抗原结合能力和 Ia 决定簇（Thèze 等，1977）。这种具有 Ia 专一性的抗原识别分子同具有重链 V 区个体型专一性的分子的关系如何；MHC 基因产物及免疫活性细胞间调节、识别的分子同参与胸腺依赖抗原识别的分子相同或不相同，这些都是迫切需要解决的问题。

总结起来，高等动物的免疫防御机制是由 T 和 B 淋巴球两套系统构成的。B 淋巴球系统的主要功能是产生能识别极其多种多样抗原的免疫球蛋白，以适应防御外来的无法预料到的微生物和毒素损伤的需要。另一方面，T 淋巴球系统的主要功能是识别细胞表面抗原，并由此区别自我的和非自我的细胞。T 细胞的这种功能集中在识别 MHC 基因产物(包括 H-2K，H-2D 和 I 区产物)，担负对同种异体细胞、突变细胞的排斥和免疫反应中细胞的相互作用，调节这两方面的作用。这种在进化过程中形成的双重免疫防御系统，每一系统各有自已的抗原识别机制，这就使免疫反应和抗体合成置于多水平的调节控制下，能更精确、灵活地适应防御内外环境不利因素的需要，而避免产生自体免疫性(Paul 和 Benacerraf，1977)。

最后，还应提到 MHC 连锁的 Ir 基因可能在进化上具有生存适应的价值。人类的某些疾病(如 Hodgkin 氏病，急性淋巴白血病，豕草热、慢性肝炎、全身性红斑狼疮等)和 HLA 类型之间存在确定的相关性，也支持这种看法 (McDevitt 和 Landy，1972)。目前这方面的知识还不多，但是可以预料免疫反应基因(及 Ia 抗原)同多种疾病(包括某些可能是病毒病因的肿瘤)易感性的相关性的深入研究，将对于了解这些疾病的发病机制，以及预测人群对疾病的易感性，将是很有价值的。

参 考 资 料

专著

Benacerraf, B. ed. (1975). Immunogenitics and immunodeficiency, MTP.

Cunningham, A. J. ed. (1976). The generation of antibody diversity: A new look. Academic Press.

Katz, D. H. and Benacerraf, B. ed. (1976). The role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses, Academic Press.

Fudenberg, H. H., et al. (1972). Basic Immunogenetics, Oxford University Press.

Grubb, R. (1970). The genetic markers of human immunoglobulins, Springer-Verlag, Berlin and New York.

Klein, J. (1975). Biology of the mouse histocompatibility-12 Complex. Springer-Verlag, N. Y.

McDevitt, H. O. and Landy, M., ed. (1972). Genetic control of immune responsiveness; Relationship to disease susceptibility, Academic Press.

Nisonoff, A., Hopper, J. E. and Spring, S. B. (1975). The antibody molecule, Academic Press.

Nezlin, R. S. (1972). Structure and biosynthesis of antibodies, Publishing House "NAUKA", Moskow (in Russian).

论文

Benacerraf, B. (1974). The genetic mechanism that control the immune response and antigen recognition. Annals of Pasteur Institute 125, 143.

Benacerraf, B. and McDevitt, H. O. (1972). Histocompatibility-linked immune response genes. *Science* 175, 273.

Benacerraf, B. and Katz, D. H. (1975). The nature and function of histocompatibility-linked immune response genes, In: "Immunogenetics and Immunodeficiency", ed. by B. Benacerraf. MTP; p. 117.

Benacerraf, B. and Katz, D. H. (1975). The histocompatibility-linked immune response genes. *Adv. Cancer Res.* 21, 121.

Benacerraf, B. and Dorf, M. E. (1976). Genetic control of immune response and immune suppression by I region genes. *Cold Spring Horbor Symp. Quant. Biol*, 41, 465.

Benacerraf, B. and Germain, R. N. (1978). The immune response genes of the major histocompatibility complex. *Immunol. Rev.* 38, 71.

Bishop, J. O. (1972). DNA-RNA hybridization. In: "Gene transcription in reproductive endocrinology", 5th Karolinska Symp. on Research Methods in Reproductive Endocrinology, p. 247.

Brack. C. and Tonegawa, S. (1977). Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U.S.A.) 74, 5652.

Brack, C., Hirama. M., Lenhard-Schuller, R. and Tonegawa, S (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* **15**, **1**.

Cohn, M., Blomberg, B., Geckler, W., Rabitt. R. and Weigert, M. (1974). First order considerations in analysing the generator of diversity. In: ''The Immune System: Genes Receptors, Signals'', p. 89.

Coleclough, C., Cooper, D. and Perry. R. P. (1980). Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes during B-lymphocyte development as revealed by studies of mouse plasmatocytoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U. S. A.)* 77, 1422.

Cook. W. D. and Scharff, M. D. (1977). Antigen -binding mutants of mouse myeloma cells. Proc. Nat. *Acad. Sci.* (U. S. A.) **74**: 5687.

Cory, S. and Adams, J. M. (1980). Deletions are associated with somatic rearrangement of immnunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **19**. 37.

Cotton, R. G. and Milstein, C. (1973). Fusion of two immunoglobulin producing myeloma cells. *Nature* **244**, 42.

Cotton, R. G. H., Secher, D. S. and Milstein, C. (1973). Somatic mutation and the origin of antibody diversity. Clonal variability of the immunoglobulin produced by MOPC21 cells in culture. *Europ. J. Immunol.* **3**, 135.

Cowan, N. J. Secher, D. S. and Milstein, C. (1976). Purification and sequence analysis of the mRNA coding for an immunoglobulin heavy chain. *Europ. J. Biochem.* **61**, 355.

Cullen, S. E., David, C. S., Shreffler, D. C. and Nathenson, S. G. (1974). Membrane molecules determined by the H-2 associated immune response genes: Isolation and some properties. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 648.

Cullen. S. E., Freed, J H. and Nathenson, S. G. (1976). Structural and serological properties of murine Ia alloantigens. *Transplant. Rev.* **30**. 236.

Cunningham, A. J. (1974). The generation of antibody diversity: Its dependence on antigenic stimulation In: ''Contemporary Topics in Molecular Immunology'', V. 3. p. 1.

Cunningham, A. J.(1976). Implications of the finding that antibody diversity develops after antigenic stimulation. In: ''The Generation of Antibody Diversity: A New Look'', p. 89.

Cunningham, A. J. and Fordham, S. A. (1974). Antibody cells can produce daughter cells of different specificty. *Nature* **250**, 669.

David, C. S., Meo, T., McCormick, J. and Shreffler, D. (1976). Expression of individual Ia specificities on T and Bcells. 1. S udies with mitogen-induced blast cells. *J. Exp. Med.* **143**, 218.

Davis, M. M., Calame. K., Early, P. W., Livant, D.L., John, R. Weissman, I. L. and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* **283**. 733.

Debré, P., Kapp, J. A. and Benacerraf, B. (1975a). Genetic control of specific immune suppression. I. Experimental conditions for the stimulation of suppressor cells by the copolymer L-glutamic acid^{50}-L-tyrosine^{50}(GT) in nonresponder BALB/C mice. *J. Exp. Med.* **142**, 1436.

Debré, P., Kapp, J. A., Dorf, M. E. and Benacerraf. B. (1975). Genetic control of specific immune suppression. II. H-2 linked dominant genetic control of immune suppression by the random copolymer L-glutamic acid ^{50}-L-tyrosine^{50}(GT) *J.Exp. Med.* **142**. 1447.

Debré, P., Waltenbaugh, C. Dorf, M. and Benacerraf, B. (1976). III. Mapping of H-2 complex complementing genes controling immune suppression by the random copolymer L-giutamic^{50} acid^{50}-L-Tyrosine^{50}(GT). *J. Exp. Med.* **144**, 272.

Dement, P., Capkova, J. Hinzova, E. and Voracova. B. (1973). The role of histocompatibility-2-linked Ss-Slp region in the contral of mouse complement. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 863.

Edelman, G. M. and Gottlieb, P. D. (1970). A genetic marker in the variable region of light chains of mouse immunoglobulins. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **67**, 1172.

Eichmann. K. (1972). Idiotypic identity of antibodiesto sterptococcal carbohydrate in in inbred mice. *Europ. J. Immunol.* **2**, 301.

Eichmann, K. (1973). Idiotype expression and the inheritance of mouse antibody clones. *J. Exp. Med.* **137**, 603.

Eichmann, K., Tung, A., and Nisonoff. A. (1974). Linkage and rearrangement of genes encoding mouse immunoglobulin heavy chains. *Nature* **250**, 509.

Frangione, B. (1975). Structure of human Igs and their varients. In: ''Immunogenetics and Immunodeficiency'', ed. by B. Benacerraf, MTP, p. 2.

Gally, J. A. and Edelman, G. M. (1970). Somatic translocation of antibody genes. *Nature* **227**, 341.

Gershon, R. K. (1974). T cell control of antibody production. Contemporary Topics in Immunobiology 3, p. 1.

Gottlieb, P D. (1974). Genetic correlation of a mouse light chain a variable region marker with a thymocyte surface antigen. *J. Exp. Med.* **140**, 1432.

Greene, M. I., Pierres, A., Dorf, M. S. and Benacerraf, B, (1977). The I-J subregion codes for determinants on suppressor factor (s) which limit the contact sensibility response to picryl chloride. *J. Exp. Med.* **146**, 293.

Hämmerling G, J., Black, S. G., Berek, C. Eichmann K. and Rajewsky, K. (1976). Idiotypic analysis of lymphocytes in vitro. II. Genetic control of T helper cell responsiveness to anti -idiotypic antibody. *J. Exp. Med.* **143**, 861.

Hengartner, H., Meo, T. and Müller, E. (1978). Assignment of genes for immunoglobulin κ and heavy chains to chromosomes 6 and 12 in mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **75**, 4494.

Honjo, T., Packman, S., Swan, D. and Leder, P. (1976). Quantitation of constant and variable region genes for mouse immunoglobulin λ chains. *Biochemistry* **15**, 2780.

Hopper, J. E. (1973). Shared heavy chain idotypic determinants on monotypic IgM-λ and IgG-κ from a single patient. *Fed. Proc.* **32**, 989.

Hozumi, N. and Tonegawa, S. (1976). Evidence for somatic rearrangement for immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **73**, 3628.

Itakura, K., Hutton, J. J., Boyse, E. A. and Old, L. G. (1972). Genetic linkage relationships of loci specifying differentiation alloantigens in the mouse. *Transplantation* **13**, 239.

Joho, R. and Weissman, I. L. (1980). V-J joining of immunoglobulin κ genes only occurs on one homologous chromosome. *Nature* **284**, 179.

Kapp, J. A., Pierce C. W. and Benacerraf, B. (1974a). Genetic control of immune respones in vitro. III. Tolerogenic properties of the terpolymer L-glutamic acid[60]-L-alanine[30]-L-tyrosine[10](GAT) for spleen cells from nonresponder (H-2 and H-2) mice. *J. Exp. Med.* **140**, 172.

Kapp. J. A., Pierce, C. W., Schlossman, S. and Benacerraf, B. (1974). Genetic control of the immune response in vitro. V. Stimulation of suppressor T cells in nonresponder mice by the terpolymer L-glutamic acid[60]-L-alanine[30] L-tyrosine[10](GAT) *J. Exp. Med.* **140**, 648.

Katz. D. H.. Dorf, M. E., Armeding, D. and Benacerraf, B. (1975). The role of products of the histocompatibility gene complex in immune response. In: ''Molecular approaches to Immunology, Miami Winter Symp.'' V. 9, 211.

Kelus, A. S. and Moore-Jankowski, J. K. (1961). An iso-antigen(γBA) of mouse γ-globulin present in inbred strains. *Nature* **191**, 1405.

Kindt, T. J. and Todd, C. W. (1969). Heavy and light chain allotypic markers on rabbit homocytotropte antibody. *J. Exp. Med.* **130**, 859.

Kindt, T. J. and Mandy, W. J. (1972). Recombination of genes coding for constant and variable regions of Ig heavy chains. *J. Immunol.* **108**, 1110.

Kindt, T. J. and Mandy, W. J. (1972). Recombination of genes caxing for constant and variable regions of Ig heavy chains. *J. Immunol.* **108**, 1110.

Kindt. T. J. and Mole, L. E. (1974). Immunoglobulin structure and rabbit allotypes. Progr. in Immunol. II., V. I., p. 13.

Kindt, T. J., Mandy, W. J. and Todd, C. W. (1970). Association of allotypic specificities of group a with allotypic specificities A11 and A12 in rabbit immunoglobulin *Biochemistry* 9, 2028.

Kindt, T. J., Thunberg. A. L., Mudgett, M. and Klapper, D. J. (1974). A study of V-region genes using allotypic and idiotypic markers. In: ''The Immune System. Genes, Receptors, Signals'', p. 69.

Kishmoto, T. and Ishizaka K. (1973). Regulation of antibody response in vitro. VI. Carrier-specific helper cells for IgG and IgE antibody response. *J. Immunol.* **111**, 720.

Kreth, H. W. and Williamson, A. R. (1973). The extent of diversity of antihapten antibodies in inbred mice: anti-NIP antibodies in CBA mice. *Europ. J. Immunol.* **3**, 141.

Kunckle, H. G. and Kindt, T. (1975). Allotypes and idotypes. In: ''Immunogenetics and Immunodificiency'', ed. by B. Benacerraf, MTP, p. 56.

Kunkel, H. G., Smith, W. K., Joslin, F. G., Natvig J. B. and Litwin, S. D. (1969a). Genetic marker of the A2 subgroup of A immunoglobulins. *Nature* **223**, 1247.

Kunkel, H. G., Natvig, J. B. and Joslin, F. G. (1969) A "Lepore" type of hybrid γ globulin *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **62**, 144.

Landucci-Tosi, S., Mage, R. G. and Dubiski, (1970). Distribution of allotypic specificities A1, A2 A14 and A15 among immunoglobulin G molecules. *J. Immunol.* **104**, 641.

Mage, R. G. (1971). Structural localization, allelic exclusion, and linkage relationship of rabbit allotypes. Progr. in Immunol. lst. Int. Congr. Immunol., p. 47.

Mage, R. G., Young-Cooper, G. O. and Alexander, C. (1971). Genetic control of variable and constant regions of immunoglobulin heavy chains. *Nature New Biol.* **230**, 63.

Mage, R. G., Lieberman, R. and Potter, M. (1973). Immunoglobulin allotypes. In: "The Antigens", V. 1. ed. by M. Sela, Academic Press p. 299.

Maki, R., Trauncher, A., Sakano, H., Roeder, W. and Tonegawa, S. (1980). Exon shuffling generates an immunoglobulin heavy chain gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **77**, 2138.

Max, E. E., Seidman, J. G. and Leder, P. (1979). Sequence of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin κ constant region gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **76**, 3450.

McDevitt, H. O. and Chinitz, A. (1969). Genetic control of the antibody responses: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. *Science* **163** 1207.

McDevitt, H. O., Deak, B. D., Shreffler, D. C., Klein, J., Stiffling, J. H. and Snell, G. D. (1972). Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus. *J. Exp. Med.* **135**, 1259.

Melli, M., Whitfield, C., Rao, K. V., Richardson, M. and Bishop J. O. (1971). DNA-RNA hybridization in vast DNA excess. *Nature New Biol.* **231**, 8.

Miller, J. F. A. P. et al. (1975). H-2 gene complex restricts transfer of delayed-type hypersensitivity in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **72**, 5095.

Milstein, C. and Pink, J. R. L. (1970). Strusture and evolution of immunoglobulins. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **21**, 209.

Milstein, C. and Munro, A. J. (1973). Genetics of immunoglobulins and of the immune reponse. In Perter, R. R. ed., "Defence and Recognition". MTP, p. 199.

Milstein, C., Brownlee, G. G., Cartwright, E. M., Jarvis J. M. and Proudfoot, N. J. (1974). Sequence analysis of immunoglobulin light chain messenger RNA. *Nature* **252**, 354.

Milstein, C. Adetugbo, K., Brownlee, G. G., Cowan, N. J., Proudfoot, N. J., Rabbits, T. H. and Secher, D. S. (1975). Immunoglobulin genes in a mouse myeloma and in mutant clones. In: "Molecular Approaches to Immunology", p. 131. ed. by E. E. Smith and D. W. Ribbons.

Milstein, C., Brownlee, G. G., Cheng. C. C., Hamlyn, P. H., Proudfoot, N. J. and Rabbits, T. H. (1976). Immunoglobulin mRNA and Ig genes. In: "The Immune System", ed. by F. Melchers and K. Rajewsky, Rpringer-Verlag p. 75.

Mozes, E. (1976). The nature of antigen specific T cell factor involved in the genetic regulation of immune response. In: "The role of products of the histocompatibility complex in immune response", eds. Katz, D. H. and B. Benacerraf. Academ. Press, p. 485.

Munro, A. J. (1975). Genetics of immunoglobulin diversity. In: "The Immune System. A course on the Molecular and Cellular Basis of Immunity", ed. by Hobart and McConnell. Blackwell Sci. Publ., p. 16.

Munro A. J. and Taussig, M. G. (1975). Two genes in the major histocompatibility complex control the immune reponse. *Nature* **256**, 103.

Munro, A. J., Taussig, M. J., Campbell, R., Williams, H. and Lawson, Y. (1974). Antigen-specific T-cell factor in cell cooperation: Physical properties and mapping in the left hand (κ) half of H-2. *J. Exp. Med.* **140**, 1579.

Murphy, D. B., Hezenberg, L. A., Okumura, K., Hezenberg, L. A. and McDevitt, H. O. (1976). A new I subregion (I-J) marked by a locus (Ia-4) controling surface determeinants on suppressor T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **144**, 699.

Natvig, J. B. and Kunckle, H. G. (1973). Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic varients, and idiotypes. *Adv. Immunol.* **16**, 1.

Natvig, J. B., Kunkle, H. G. and Litwin, S. D. (1967). Genetic markers of the heavy chain subgroups of human G globulin. *Cold Spring Harbor Symp.* **32**, 173.

Natvig, J. B., Kunkle, H. G. and Joslin, F. C. (1969). Delineation of two antigenic markers, "non a" and "non g" related to the genetic antigens of human globulin. *J. Immunol.* **102**, 611.

Nisonoff, A., Wilson, S. K., Wang, A. C., Fudenberg, H. H. and Hopper, J. E. (1971). Genetic control of the biosynthesis of IgG and IgM. In: "Progress in Immunology", p. 61.

Paul, W. E. and Benacerraf, B (1977). Functional specificity of thymus dependent lymphocytes. *Science* **195**, 1293.

Pernis. B. (1967). Relationship between the heterogeneity of immunoglobulins and the differentiation of plasma cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **32**, 333.

Polmar, S. H. and Steinberg, A. G. (1964). Dependence of a Gm(b) antigen on the quarternary structure of human gamma-globulin. *Science* **145**, 928.

Press, J. L., Klinman, N. R. and McDevitt, H. O. (1976). Expression of Ia antigens on hapten specific B cells. I. Delineation of B cell subpopulation, *J. Exp. Med.* **144**, 414.

Proudfoot, N. J. and Brownlee, G. G. (1974). Sequence at the 3'end of globulin mRNA shows homology with immunoglobulin light chain mRNA. *Nature* **252**, 359.

Rabbitts, T. H., Matthyssens, G., and Hamlyn, P. H. (1980a). Contribution of immunoglobulin heavy-chain variable-region genes to antibody diversity. *Nature* **284**, 238.

Rabbitts, T. H., Forster, A., Dunnick, W. and Bentley, D. L. (1980b). The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chain switch. *Nature* **283**, 351.

Rabitts, T. H. and Milstein, C. (1977). Quantitation of antibody genes by molecular hybridization. In: "Contemp. Topics in Mol. Immunol.", V. 6, p. 117.

Review of the Notation of the allotypic and related markers of human immunoglobulins. *J. of Immunogenetics* **3**, 357.

Sakano, H., Huppl, K, Heinrich, G. and Tonegawa, S. (1979). Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* **280**, 288.

Scharff, M. D., Birshtein, B. K., Dharmgrongartama and Margulies, D. H. (1976). Somatic instability of mouse immunoglobulin genes. In: "The Generation of Antibody Diversity: A New Look", ed. by A. J. Cunningham.

Schwartz, R. H., Fathman, C. G. and Sachs, D. H. (1976). Inhibition of stimulation in murine mixed lymphocyte cultures with an alloantiserum directed against a sheares Ia determinant. *J. Immunol.* **116** 929.

Seidman, J. G., Edgell, M. H. and Leder, P. (1978). Immunoglobulin light chain structural gene sequences cloned in a bacterial plasmid. *Nature* **271**, 582.

Seidman, J. G., Leder, A., Edgell, M. H., Polsky, F. I., Tilghman, S., Tilgman, S., Tiemeier, D. C. and Leder, P. (1978b). Multiple related immunoglobulin variable region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **75**, 3881.

Seidman, J. G., Leder, A., Nau, M., Norman, B. and Leder, P. (1978c). Antibody Diversity. *Science* **202**, 11.

Shreffler, D. C. and David, C. S. (1975). The H-2 major histocompatibility complex and the I-immune response region. Genetic variation, functon and organization. *Adv. Immunol.* **20**, 125.

Smith, M. and Hirschhorn, K. (1978). Location of the genes for human heavy chain immunoglobulin to chromosome 6. *Proc. Nat., Acad. Sci.* (U. S. A) **75**, 3367.

Snell, G. D. (1978). T cells, T cell recognition structures, and the major histocompatibility complex. *Immunol. Rev.* **38**, 3.

Strosberg, A. D., Hamers-Casterman, C., van der Loo, W. and Hamers, R. (1974). A rabbit with the allotypic phenotype: ala2a3, b4b5b6. *J. Immunol.* **113** 1313.

Tada, T., Taniguchi, M. and David, C. S (1976). Properties of the antigen-specific suppressive T-cell factor in the regulation of antibody response in the mouse. IV. Special subregion assignment of the genes that codes for suppressive T-cell facror in the H-2 histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* **144**, 713.

Taussig, M. O., Munro, A. J. and Luzzati, (1976). I-region gene products in cell cooperation. In: "The Role of products of the histocompatibility gene complex in immune responses".

Thèze, J., Waltenbaugh, C., Dorf, M. E. and Benacerraf, B. (1977). Immunosuppressive factors specific for L-glutamic acid^{50}-L-tyrosine^{50}(GT). II. Presence of I-J determinants on the GT suppressive factor. *J. Exp. Med.* **146**, 287.

Todd, C. W. (1963). Allotypy in rabbit 19S protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 170.

Tonegawa, S. (1976). Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: Further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**, 203.

Tonegawa, S. and Steinberg, C. (1976). Too many chains—too few genes. In: "The Generation of Antibody Diversity", ed. by A. J. Cunningham, p. 175.

Tonegawa, S., Steinberg, C., Dube, S. and Bernardini, A. (1974). Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **71**, 4027.

Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N. and Schuller, R. (1977). Cloning of an immunoglobulin variable region gene from mouse embryo. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **74**, 3518.

Tonegawa, S., Maxam, A. M., Tizard, R., Bernard, O. and Gilbert, W. (1978). Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **75**, 1486.

Tosi, L. S., Mage R. G., Dubiski, (1970). Distribution of allotypic specificities A1, A2, A14 and A15 among immunoglobulin G molecules. *J. Immunol.* **104**, 641.

Tosi. R. M., Landucci-Tosi, S. and Chersi, A. (1974). Isolation of recombinant IgG molecules carrying heavy chain allotypes transmitted in repulsion. *J. Immunol.* **113**, 876.

Weigert, M., Gatmaitan, L., Loh, E., Schilling, J. and Hood, L. (1978). Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* **276**, 785.

Weigert, M., Perry, R. Kelley, D., Hunkapiller, T., Schilling, J. and Hood, L. (1980). The joining of V and J gene segments creats antibody diversity. *Nature* **283**, 497.

Williamson. A. R. (1976). The biological origin of antibody diversity. *Ann. Rev. Biochem.* **45** 467.

Williamson, A. R. and Fitzmaurice L. C. (1976). Arrangement and rearrangement of antibody genes. In: "The Generation of Antibody Diversity". "A. New Look", p. 183.

Williamson, B. (1978). Split gene transcription. *Nature* **272** 753.

第五篇　免疫球蛋白及有关分子的进化

免疫性是在长期进化过程中逐步发生和完善起来的。对外源物质的识别似乎是真核生物的普遍特性。这种特性在进化上可能与吞噬作用有同样古老的起源。随着多细胞动物的出现和胚层的分化，细胞表面的专一识别在形体的建造和维持中起着重要的作用。海绵动物的细胞之间已存在物种专一的识别和聚集能力。原始的免疫反应能力（免疫识别和排斥）在腔肠动物已有初步的表现。在高等无脊椎动物（环节动物和棘皮动物）已证实存在类似脊椎动物的细胞免疫性，表现为对异体移植物专一的排斥能力和免疫记忆。虽然在无脊椎动物已证明有天然的凝集素、杀菌素和溶血素存在，但从未发现过有类似免疫球蛋白的抗体。细胞免疫和体液免疫(抗体)结合起来的免疫防御机制是在脊椎动物中,随着淋巴样系统结构和功能的复杂化,而逐步进化出来的（Hildemann，1974； Du Pasquir，1976)(图1)。

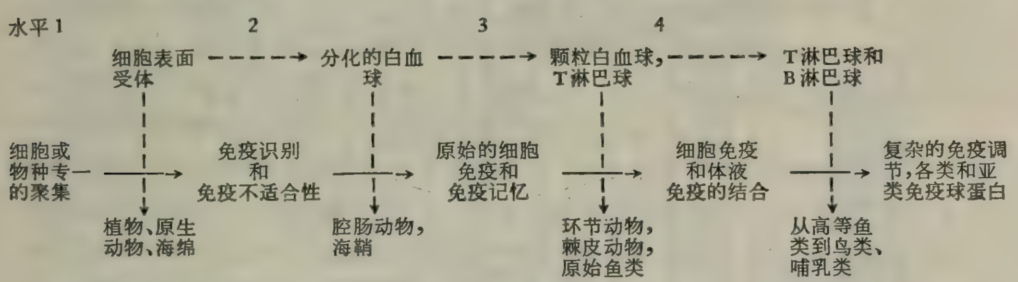


图 1　免疫反应能力系统发生的主要阶段。从腔肠动物起，已开始出现专一的免疫反应能力。高等无脊椎动物(环节动物、棘皮动物)始出现细胞免疫及免疫记忆。免疫反应能力的进化是随淋巴样系统结构和功能的复杂化而逐步进化的(据 Hildemann，1974)。

在原索动物如海鞘已有类似淋巴球的细胞,并表现专一的对异体移植物的排斥能力。现存脊椎动物的最原始种类圆口类(如八目鳗)开始出现原始的淋巴样系统（构造非常简单的胸腺和脾脏),同时在不同程度上表现出脊椎动物免疫反应能力的各种特征。除了专一的细胞免疫和免疫记忆外,圆口类还表现出一定程度的体液免疫能力,能对少数抗原起反应，产生类似 IgM 的抗体。在软骨鱼类淋巴样系统的发育程度更高，出现真正的胸腺和脾脏，体液免疫和细胞免疫能力都有提高。随着浆细胞的出现，高等软骨鱼和软骨硬鳞鱼的抗体合成能力进一步加强。在高等硬骨鱼类开始出现和 Ig M 不同类型的免疫球蛋白。两栖类已出现原始的淋巴结以及 T 和 B 细胞功能的初步分化。各种 T 细胞功能，如对有丝分裂原的增生反应，MLC 反应、移植物抗寄主反应，T 和 B 细胞协同效应等都有不同程度的表现。在原始爬行类中枢淋巴样组织(如扁桃腺)有明显的发育，在高等爬行类还出现 Peyer 淋巴细胞团。鸟类出现法氏囊，T 和 B 细胞的功能分化更趋完善。在哺乳类免疫系统在结构和功能上都得到最高度的发展(图 2)。

在对脊椎动物免疫系统的进化作过粗略叙述后，我们将在本篇内讨论脊椎动物各纲

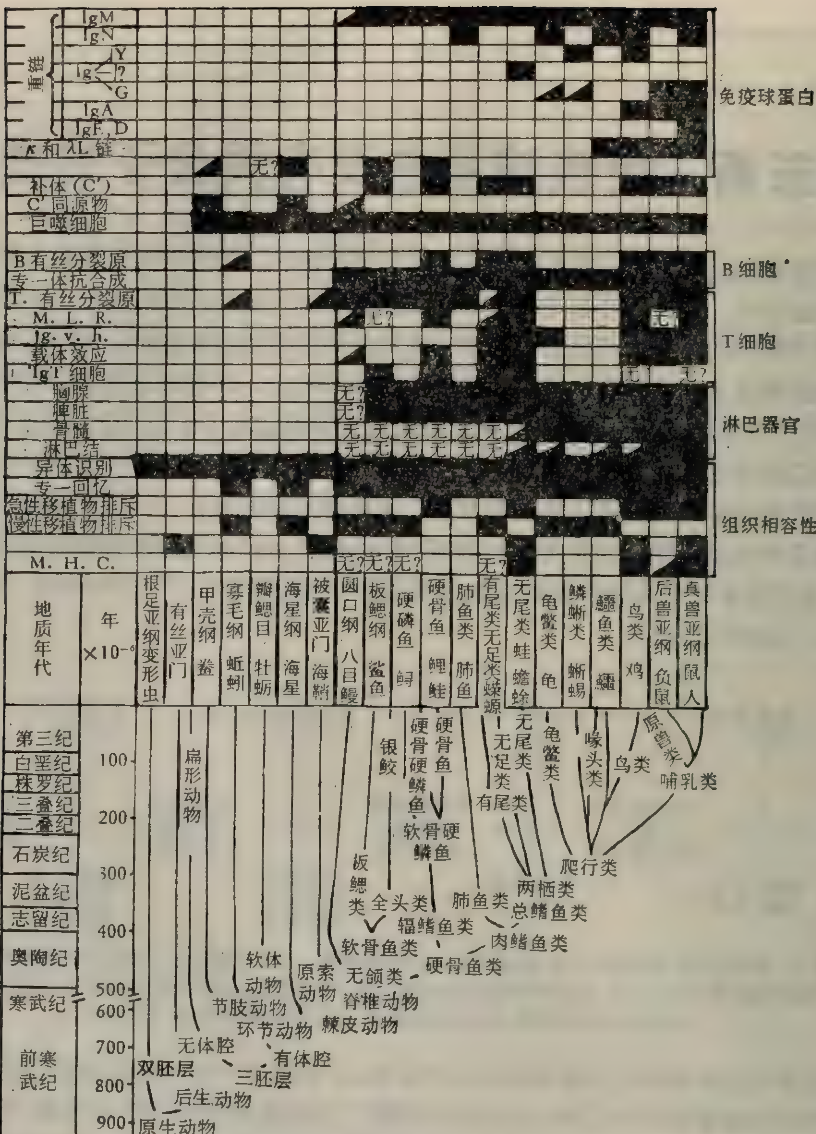


图 2　免疫系统的进化(据 Du Pasquier, 1976)。(M. L. R.)混合淋巴球反应 (g. v. h.) 移植物抗寄主反应 (M. H. C.) 主组织相容性基因复合物。

免疫球蛋白的系统发生，免疫球蛋白分子进化及其遗传机制的问题。由于补体系统和组织相容性抗原与免疫球蛋白在功能上和遗传控制上存在密切的关系，也将讨论这些分子和免疫球蛋白在进化上可能存在的某些关联。

第十六章 免疫球蛋白的进化

对现存脊椎动物的广泛比较研究证明所有的种类(除最原始的种类尚有疑问外)都存在具有四条链基本构造的免疫球蛋白。如前述，虽然在某些无脊椎动物已出现适应免疫现象，但是从未发现过在结构上同免疫球蛋白相似的分子。许多无脊椎动物(如鲎、蜗牛和海星等)的体液中存在天然凝集素(能凝集细菌、原生动物和红血球等)并表现出促进吞噬细胞的吞噬作用的能力。然而，它们的结构却没有和免疫球蛋白共同之处。显然，从无脊椎动物到脊椎动物之间，过渡性质的抗体分子已经消失在漫长的进化史中，已无从查考。因此，我们目前对免疫球蛋白分子进化的讨论仅限于脊椎动物各纲的范围以内。

根据对哺乳动物的研究，同一物种的各类和亚类的免疫球蛋白都是由一个或多个具有四条链(两条重链和两条轻链)的亚基构成的。各类免疫球蛋白的轻链都是相同的(λ 或 κ 型)。它们的区别主要在于重链的结构以及链间二硫键的数目和位置的不同。按照结构上的差异，重链可区分为 μ，γ，α，ε，δ 五种链；相应地免疫球蛋白可区分为 IgM， IgG，IgA，IgE，IgD 五类。在最原始的脊椎动物是否存在和哺乳动物的免疫球蛋白的基本构造相似的抗体分子？在脊椎动物系统发生中，各类免疫球蛋白出现的先后顺序如何？是否存在其他类别的分子？这些是首先需要讨论的问题。

正如比较解剖学是研究动物进化的古典工具一样，“分子比较解剖学”——蛋白质一级结构的比较是研究分子进化的现代工具。根据遗传学的“中心法则”，蛋白质的一级结构是由 DNA 荷载的遗传信息决定的。也就是说蛋白质的一级结构包含着基因的遗传信息。因此，蛋白质分子的进化反映基因的进化。蛋白质分子进化的研究，除了能重建现存物种的进化史外，还能提供有关分子的进化速度、结构和功能演变的适应意义以及分子进化的遗传机制等方面的证据（Arnheim，1973；Ayala，1976)。目前低等脊椎动物免疫球蛋白一级结构的研究资料还很少，然而在哺乳类方面的研究已取得很有理论意义的结果。如前所述，对人和小鼠免疫球蛋白肽链一级结构的比较研究，发现重链和轻链都可分成易变区（V）和不变区 （C)。重链的 V 区 （V_H） 和轻链的 V 区 （V_L） 有相当高的同源性。重链的 C 区含有 3—4 个功能区（C_H^1,C_H^2,C_H^3,C_H^4)，彼此之间有很高的同源性，它们又和轻链的 C 区 (C_L) 同源。此外，V 和 C 之间也在较低的程度上同源。从这些结果得出的假说，V 和 C 基因可能起源于共同的祖先基因。在免疫球蛋白的早期进化过程中，V 和 C 基因发生异趋后是各自独立进化的。对 V 和 C 的各功能区一级结构的比较研究，对于阐明轻链（κ 和 λ)、各类重链在进化上的起源和演变(出现年代，相互关系等)以及 V 区多样性起源的遗传机制等问题是有重要意义的。

根据对位于系统发育不同水平的脊椎动物免疫球蛋白的特性以及哺乳类重链和轻链一级结构比较研究的现有资料，对于上述问题已能得到一些初步的解答。

一、脊椎动物各纲免疫球蛋白的系统发生

脊椎动物各纲在系统发生上的关系和出现的大约年代，如图 16-1 所示。它们的免疫反应能力(产生抗体的量、类别和多样性，以及免疫记忆)也是随淋巴样系统在组织结构上的进步而逐渐发展和完善起来的(表 16-1)。

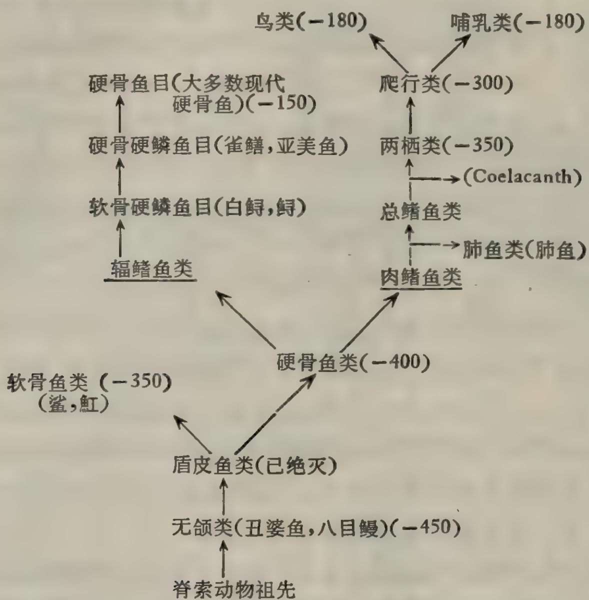


图 16-1 脊椎动物的进化。括号内的数字表示进化过程中出现的大约年代(年$\times 10^{-6}$)(据 Romer, 1970)。

(一) 圆 口 纲

现存脊椎动物最原始的种类分为盲鳗目 (Myxinoidea) 和石吸鳗目 (Petromyzontia)。

1. 丑婆鱼 (*Eptatretus stoutii*, 英俗名 Hagfish)

属盲鳗目。免疫系统的构造最原始。成体有淋巴细胞，但没有聚集成团的淋巴样组织 (Theones 和 Hildemann, 1970)。对异体移植物呈现免疫排斥现象。

早期诱导抗体的实验没有成功。后来，改进了饲养条件，结果证明有相当广泛的产生抗体的能力。如用羊红血球或钥孔蝛血蓝蛋白免疫后，2—3 个月后能形成专一的抗体，不过效价很低 (Theones 和 Hildemann, 1970)。抗体活力分布在高分子量 (23S) 的球蛋白部分。同 IgM 的同源性尚不能肯定。

2. 八目鳗 (*Petromyzon marinus*)

属石吸鳗目，比盲鳗要高等一些，具有原始的淋巴样系统，结构很简单。幼鱼鳃区有

表 16-1 脊椎动物各纲免疫系统构造和功能的比较

纲	淋巴球	浆细胞	胸腺	脾脏	淋巴结	法氏囊	抗体	异体植片的排斥
被囊类	+(?)	−			−	−	?	+(?)
圆口类								
八目鳗	+	−	原始	原始	−	−	+	+
丑婆鱼(Hagfish)	+	−	未发现	未发现	−	−	+	+
板鳃类								
低等种类	+	−	+	+	−	−	+	+
高等种类	+	+	+	+	−	−	+	+
硬骨硬鳞鱼类								
亚美鱼	+	+	+	+	−	−	+	+
软骨硬鳞鱼类								
白鲟	+	+	+	+	−	−	+	+
硬骨鱼类	+	+	+	+	−	−	+	+
肺鱼类	+	+	+	+	−	−	+	+
两栖类								
有尾类	+	+	+	+	−	−	+	+
无尾类	+	+	+	+	+(?)	−	+	+
爬行类	+	+	+	+	+(?)	+(?)	+	+
鸟类	+	+	+	+	+(?)	+	+	+
哺乳类								
原兽类	+	+	+	+	+(?)	+(Eq.)	+	+
后兽类	+	+	+	+	+	+(Eq.)	+	+
真兽类	+	+	+	+	+	+(Eq.)	+	+

Eq 示具有同等功能的淋巴样器官。
(据 Marchalonis, 1977)。

分散的淋巴细胞团,可能相当于原始的胸腺,前肠折陷处有原始的脾脏(Good 等,1966)。

八目鳗的抗体的性质还有争论。对噬菌体 f_2能形成专一的抗体;对羊红血球,甚至免疫一个月后,仍只有很弱的抗体反应;对血兰蛋白没有反应。抗噬菌体 f_2 抗体的活力位于沉降常数为 14S 和 6.6S 的球蛋白部分,后者占优势。分子量高低不同的这两部分表现相同的或相似的抗原性,提示 14S 分子可能是 6.6S 分子的多聚体。将 6.6S 分子溶于 1*M* 丙酸内凝胶过滤时,分离为约呈等克分子量的两个亚基,分子量分别为 70,000 和 25,000,表明可能是缺少链间二硫键连接的 H 链和 L 链。

另一方面,Litmann 等(1970)却不能找到重链和轻链。他们用人红血球长期免疫,得到一个抗体部分(分子量为 320,000;9S)。放置时,自动降解为抗原性相同的亚基,分子量为 150,000 和 75,000。

这两个实验得到的结果不一致,尚待进一步研究解决。然而,根据现有资料仍可得出结论,圆口类已有初步形成抗体的能力。

(二)板鳃纲(软骨鱼类)

远古原始鱼类分两枝进化。一枝为软骨鱼类,保留着原始的性质;另一枝为硬骨鱼类,不断向更高等的种类发展。从软骨鱼类以上,所有脊椎动物都已有基本组织结构类

表 16-2　L 链不封闭 N 端氨基酸排列顺序的比较

排列顺序	1　　　　10　　　　20　　　　28	与鲨 225 L链相同的残基数目
鲨 L （抗体225）	Asp Ile Thr met Thr Glu Ser Pro Pro Val Leu Ser Val Gly Leu Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser — Ser 　　Val	
鲨 L （抗体 Francis）	Lys Asp Ile Thr Met Thr Glu Ser Pro Pro Val Leu Ser Val Gly Leu Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glx Ser 　　Val　　Leu	26
鲨 L （正常血库）	Lys Asp Ile Thr Met Thr Glu Ser Pro Pro Val Leu Ser Val Gly Leu Gly Gln Thr Ala Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Glx Ser 　　Val　　Leu	26
人 κ_{I} (ou)	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glx Thr	15
人 λ_{II} (vic)	His Ser Ala Leu Thr Gln — Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Leu Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser	10
非洲肺鱼 I	Asp — — Leu Thr Glx Asx Gly Ser Met 　　　　　　　　　　　　Ala　　Leu	
鸡 λ	— — Ala Leu Thr Glx Pro Ala Ala Val	

（据 Nisonoff 等，1975）。

似哺乳动物的胸腺和脾脏的淋巴样器官，形成抗体的能力和复杂性也逐步提高。

软骨鱼已有较强的形成抗体的能力，能对细菌、病毒和各种可溶性抗原和半抗原起反应，并且呈现典型的次级反应(免疫记忆)。对几种鲨鱼抗体的性质作过详细研究(Marchalonis 和 Edelman, 1965; Clem 等, 1967; Clem 和 Small, 1967; Frommel 等, 1971)，均发现存在分子大小为 19S 和 7S 的两类免疫球蛋白。两类分子都是由重链和轻链构成的。重链的分子量约为 70,000，轻链约为 22,000。两类分子的重链的分子量、酶解肽段图谱、电泳行为和抗原性以及糖含量、被木瓜酶消化的性质都是相同的。同时，鲨鱼重链的所有这些性质又是和哺乳类 μ 链相似的 (Marchalonis 和 Edelman, 1965)。

对豹鲨和角鲨之轻链 N 端氨基酸排列顺序的比较，指明 19S 和 7S 免疫球蛋白之轻链和轻链之间以及它们和哺乳类 κ 链之间，均有许多相似的地方，表明它们有共同的起源(表 16-2) (Suran 和 Papermaster, 1967)。

在离体非变性条件下还原时，19S 分子便降解为 7S 分子。这一事实以及前述 19 S 和 7 S 分子的重链有相同的抗原性，表明 7S 分子是组成 19S 分子的单体，它们通过链间二硫键相连成多聚体。此外，还发现只有 19S 分子存在类似"J"链的肽链 (Klapper 和 Clem, 1972)。电子显微镜观察还看到鲨的 19S 抗体分子是形态类似 IgM 的五聚体 (Johnston 等, 1971)。

总之，所有以上的证据都表明鲨的 19S 免疫球蛋白可能是和哺乳类的 IgM 同源的。并且，如以后将提到的，从软骨鱼以上的脊椎动物各纲都普遍存在类似 IgM 的分子。由此可见，这类免疫球蛋白是最原始的，并且在进化过程中有很明显的保守性。

(三) 硬 骨 鱼 纲

在地球史上，远在泥盆纪中期(距今三亿多年前)已经出现硬骨鱼类。它们在进化上循两枝发展：一枝为辐鳍鱼类，演进为现代的硬骨鱼；另一枝，肉鳍鱼类是原始两栖类的直接祖先(图 16-1)。辐鳍鱼亚纲又分为三个目，软骨硬鳞鱼(鲟，白鲟等)，全骨鱼(雀鳝、亚美鱼等)和硬骨鱼目(包括现代硬骨鱼的大多数种类)。软骨硬鳞鱼是现存硬骨鱼类最原始的代表。从泥盆纪到二叠纪，软骨硬鳞鱼就逐渐被全骨鱼(硬骨硬鳞鱼)所代替。从三叠纪到白垩纪，全骨鱼盛极复衰，又被硬骨鱼代替，直到现代。另一方面，总鳍鱼是从肉鳍鱼过渡到原始两栖类的直接祖先。过去认为它们已经全部绝灭，后来发现只剩下极少数非常罕见的"活化石"，如矛尾鱼。残存在澳洲和非洲的肺鱼，虽不是陆生脊椎动物的直接祖先，但是相当接近从总鳍鱼到原始两栖类进化的一个残存的分枝。它们作为向陆生过渡类型的现代代表，在免疫球蛋白系统发生的研究上仍然是有珍贵价值的。

1. 辐鳍鱼类

所有已经研究过的辐鳍鱼类，从低等的(白鲟，雀鳝)到高等的(鲤、鲳和金鱼等)都存在高分子量的、类似 IgM 的免疫球蛋白，并且可能是由 4 条链的亚基构成的四聚体。分子量的测定 (630,000—700,000) 和电镜观察到的分子形态 (有四臂) 都支持这一结论 (Shelton 和 Smith, 1970; Acton 等, 1971 a, b, c)。白鲟、雀鳝和鲶鱼的高分子量 Ig

的糖含量虽然和人 IgM 相近，但糖的组成有明显的不同。此外，其重链的分子量的修正值为 58,000（Acton 等，1971b），也和人的 μ 链不同。鉴于分子的这些特点（重链分子量和糖组分的不同，四聚体），辐鳍鱼类的高分子量免疫球蛋白与哺乳类的 IgM 有多大同源性，尚属疑问。

至于是否存在低分子量（7S）抗体，结果也不一致。雀鳝和金鱼对于蛋白质抗原或蛋白质半抗原复合物都不能产生低分子量抗体。可是，也有人报告鲳能形成位于 6.4S 部分的抗-DNP 抗体（Clem，1971）。

2. 肺鱼；一种低分子量免疫球蛋白 IgN 的新出现

肺鱼是肉鳍鱼一个侧枝残存的代表，保留着适应陆生生活的原始特征，在免疫球蛋白的进化上也占重要位置。现存的两种肺鱼，澳洲肺鱼（*Neoceratodus*）和非洲肺鱼（*Protopterus aethiopicus*），具有分子量大小和抗原性都不相同的两类免疫球蛋白。这种低分子量的免疫球蛋白的新出现标志着抗体分子进化的一个新阶段，即和原来存在的类似 IgM 异趋的一类新的免疫球蛋白的出现。从理论上推测，这一异趋事件至少应发生在两种肺鱼在地理上隔离之前，即至少在两亿年以前。这种重链异趋的过程继续不断地进行，其结果从鱼纲以上，所有在进化上更高等的类型（最原始两栖类也许除外）都至少有两类以上的免疫球蛋白，一类为高分子量的，其他类为低分子量的。

澳洲肺鱼和非洲肺鱼的大分子量免疫球蛋白的沉降常数约为 19S，并可能是由 4 条链的亚基连接成的四聚体，因而仍具有 IgM 的基本构造特点（Marchalonis，1969；Litman 等，1971）。同软骨鱼类和其他较原始的鱼类不同，肺鱼没有一个抗原性上同 19S 分子相关的 7S Ig，而是有一个抗原性独特的 5.8S 的免疫球蛋白。这一类新出现的免疫球蛋白的分子量为 120,000；其重链分子量为 38,000，可能只包含有三个功能区。19 S Ig 的重链的分子量为 70,000，可能包含五个功能区（Marchalonis，1970）。肺鱼轻链 N 端 9 氨基酸残基排列顺序和其他物种的比较见表 16-2。它们之间显然存在某种同源性，但是属于 κ 型还是 λ 型尚无法肯定。

由于存在上述许多特点，肺鱼的这一类新出现的低分子量免疫球蛋白被称为 IgN，相应的重链称为 ν (niu) 链。除肺鱼外，类似 IgN 的分子还存在于爬行类、鸟类，甚至某些哺乳类。IgN 和哺乳类的 IgG 的关系如何，是否是哺乳类 IgG 的先驱分子，还是各自独立起源，平行进化的，尚不能断定。

（四）两　栖　纲

1. 无尾类

无尾两栖类如牛蛙（*Rana catesbiana*）的抗体存在高分子量（18S）和低分子量（7 S）两类。当用噬菌体 f_2 免疫时，早期（15 天内）出现的抗体完全是 18 S 分子。35 天后，同时存在 6.7S 和 18 S 抗体分子。58 天后 6.7 S 分子在量上占优势，不过 18 S 抗体的浓度并未减少。这两类抗体重链的抗原性有差异；分子量各为 72,000 和 53,000（相当于有 5 个或 4 个功能区），糖含量分别为 10.8% 和 2.1%。此外，电泳迁移率也各自同人的 μ 链和 γ 链相近（Marchalonis 和 Edelman，1966）。这些资料提示这两类抗体可能

相当于人类的 IgM 和 IgG。其它无尾类（如爪蟾）也存在分子量大小不同的两类免疫球蛋白。

无尾两栖类抗体反应的强度（抗体产生的速度，次级反应的强度，效价等）都超过鱼类。特别值得注意的，抗体反应对温度表现明显的依赖性。如海蟾（*Bufo marinus*）用细菌鞭毛免疫时，抗体出现的时间在 37°C 要比在 22°C 时快得多。在高温时，免疫后第 3 天就出现抗体形成细胞，7 天达到高峰；在低温时，则分别延长到 7 天和 14 天。抗体出现的时间也相应地延迟，不过最终达到的效价还是相同的（Diener 和 Marchalonis，1970）。两栖类个体发育的特点是存在变态。在个体发育过程中，两类免疫球蛋白出现的顺序如何呢？研究结果发现在蝌蚪期已经出现这两类免疫球蛋白。

2. 有尾类

Marchalonis 和 Cohn（1973）从一种低等的有尾类泥狗（*Necturus maculosis*）血清中分离出一种类似 IgM 的分子，分子量约为 900,000，重链分子量为 70,000，轻链分子量为 22,000。但是，没有找到低分子量的抗体。很有趣的是，原始两栖动物对半抗原载体的免疫反应中，已经表现出细胞协同作用。

总之，现有的资料说明，两栖类已出现一类与 IgN 不同的可能相当于哺乳动物 IgG 的低分子量的免疫球蛋白。这似乎提示，非 IgM 的低分子量免疫球蛋白可能在低等脊椎动物各纲内独立地起源和进化。

（五）爬 行 纲

这一纲研究过的种类很少，还很难同高等脊椎动物比较。对三种龟的免疫球蛋白的理化性质作较详细的研究后，发现存在高分子量和低分子量的免疫球蛋白（Leslie 和 Clem，1972；Chartrand 等，1971；Acton 等，1972）。高分子量的免疫球蛋白的分子大小、肽链结构和糖含量都和人 IgM 相似。电镜观察到的分子形状也是五聚体。低分子量抗体又分为 7.5S 和 5.7S 两类。在这三种龟，后者是主要的低分子量抗体，分子量约为 120,000，其重链的分子量约为 38,000。在这一方面，更近似肺鱼的 IgN。另一种低分子量的免疫球蛋白（7.5S）的重链的分子量约为 67,500。鳄蜥是现存最原始的爬行动物，具有分子量高低不同的两类免疫球蛋白（18S 和 7S），没有发现 5.7S 的免疫球蛋白（Marchalonis 等，1969），蜥蜴也是如此。在鳄始初次发现两种不同类型的轻链。然而，是否相当于高等脊椎动物的 κ 和 λ 链，还有待进一步的研究（Saluk 等，1970）。

（六）鸟纲：IgA 的出现

由于体温恒定和淋巴样系统组织构造上的进步（胸腺和法氏囊以及 T 和 B 细胞的功能分化），鸟类的体液免疫能力获得高度的发展。

鸟类抗体研究最详细的两个种是鸡和鸭。根据对鸡的研究，至少存在相当于人的 IgM，IgG 和 IgA 的三类抗体。前两类抗体存在于血清内，而含量以 IgG 为主。IgA 在血清内的含量很低，可是在胆汁内的含量却很高（Orlans 和 Rose，1972；Lebecq-

Verheyden 等，1972）。 这一类抗体能专一地同人的分泌片结合（Bienenstock 等，1972），并且从胆汁中提取的 IgA 比血清 IgA 要多一个抗原决定簇，可能是分泌片或“J”链。所有这些证据都表明鸟类已存在相当于哺乳类 IgA 的抗体。至于更低等的脊椎动物，有人观察到蟾蜍肠粘膜内存在类似浆细胞的细胞，但不能断定是否能合成 Ig A。鸟类 IgG 是否真正相当于哺乳类的 IgG，还有疑问。鸟类 7S 免疫球蛋白的重链分子量为 67,000，要比哺乳类的 γ 链长。据推测可能含有 5 个功能区，而 γ 链只有 4 个功能区。因此，Leslie 和 Clem（1969）主张把鸟类的 7S 免疫球蛋白称为 IgY，以示和哺乳类 IgG 的区别。

鸭的免疫球蛋白很特别，几乎可以看作是鸡和龟鳖类之间的中间类型。鸭血清内存在三类免疫球蛋白。主要的一种为类似龟鳖的 5.7S 的免疫球蛋白。另外两种为 19 S 的 IgM 和 7.1S 的 IgY。 5.7S 抗体的重链的分子量为 35,000，可能只有三个功能区（Zimmermann，1971）。因此，有人认为是和肺鱼的 IgN 属于同一类型。

实际上，IgN 类型的抗体在各种脊椎动物分布很广，从肺鱼开始，在爬行类、鸟类的一些种，后来甚至在哺乳类的袋鼠(Thomas 等，1972）和家兔（Steward 等，1969）都发现性质类似 IgN 的分子存在。

（七）哺　乳　纲

在动物进化史中，哺乳类的祖先在大约两亿年前就同爬行类的兽脚类异趋了。现存的哺乳类按进化的阶梯分为三个亚纲，即原兽亚纲(鸭嘴兽、针鼹)、后兽亚纲(袋鼠)和真兽亚纲(绝大多数哺乳动物)。

发生在低等脊椎动物中的免疫球蛋白分子进化的趋势，在哺乳类几个亚纲中继续进行下去。虽然在两栖类、爬行类和鸟类都存在非 IgM 的低分子量的免疫球蛋白（Ig N，IgY，IgG(?)），真正和人 IgG 同源的抗体分子在原始哺乳类才出现。原兽亚纲的针鼹和后兽亚纲的蓬尾负鼠都存在 7S Ig，其重链近似 γ 链。并且，针鼹 γ 链 N 端的部分顺序和人重链 V_{HIII} 亚族相近似（Marchalonis，1977）。因此，可以合理地推测原始 γ 链的起源时间至少应在原兽类和它的爬行类祖先异趋之前。 其他类别的免疫球蛋白（Ig A，IgE 等）也在各种哺乳动物之间广泛分布。

与导致产生重链类别相似的基因倍增和突变的遗传事件可能在哺乳类的目和属的进化过程中进行。IgG 亚类的数目在不同物种有很大变化，如人类为四个亚类，豚鼠和牛有两个，家兔只有一个。这提示 IgG 亚类的进化在不同的物种是独立进行的。同样地，哺乳类各目的物种形成，也出现重链 V 区各亚族的分化。

总之，哺乳类中免疫球蛋白进化的趋势是增加肽链结构的多样性。各亚类、亚族和同种异型的分化是进化上较近的事件，它们可能反映出各类免疫球蛋白进化的遗传机制。

概括起来，脊椎动物免疫球蛋白的系统发生可得出几点重要的结论：

1）从最原始的种类开始，免疫球蛋白四条链构造的基本形式，在脊椎动物进化早期就已经确立了。因此，V，C 基因异趋应追溯到脊椎动物起源或以前的时候；

2）至少从软骨鱼类开始，脊椎动物各纲都存在类似哺乳动物 IgM 的抗体分子。这说明 IgM 和 μ 链可能是最原始的；同时在进化过程中也是最保守的。另一方面，IgM 的聚

表 16-3　低等脊椎动物之非 IgM 免疫球蛋白的特性

物种名	纲名	完整分子	轻链	重链	CHO(%)	名称	分子式
肺鱼	肺鱼纲	120,000	22,000	38,000	无数据	IgN	$L_2\nu_2$
牛蛙	两栖纲	(150,000)	22,000	53,000	2.0	IgG(?)	$L_2\gamma(?)_2$
海蟾	两栖纲	160,000	22,500	53,000	4.2	IgG(?)	$L_2\gamma(?)_2$
爪蟾	两栖纲	无数据	22,000	53,000	无数据	IgG(?)	$L_2\gamma(?)_2$
			26,700	64,500	无数据	IgG(?)	$L_2\gamma(?)_2$
甲鱼	爬行纲	180,000	22,500	67,500		IgG(Y)	$L_2\gamma(Y)_2$
		120,000	22,500	38,000	0.9	IgN	$L_2\nu_2$
睡蜥蜴	爬行纲	151,000	22,400	51,000	无数据	IgG(?)	$L_2\gamma(?)_2$
鸭	鸟纲	178,000	22,400	68,000	5.0	IgG(Y)	$L_2\gamma(Y)_2$
		118,000	23,000	35,000	0.6	IgN	$L_2\nu(?)_2$
鸡	鸟纲	174,000	22,500	67,500	2.2	IgG(Y)	$L_2\gamma(Y)_2$
		无数据	无数据	无数据	无数据	IgA	$(L_2\alpha_2)$
针鼹	哺乳纲单孔目	150,000	22,500	49,000	2.0	IgG	$L_2\gamma_2$

(据 Marchalonis, 1977)。

合状态在不同的纲却可能不同。从 $L_2\mu_2$ 单体的形式变化到六聚体的形式。例如，人和鲨的 IgM 为五聚体（鲨血清中有相当数量的 7S 单体），爪蟾为六聚体，而硬骨鱼为四聚体。IgM 的聚合形式在一个纲的范围内是恒定的；

3）从肺鱼起，在系统发生上更高级的种类，逐次出现与IgM 不同的各类免疫球蛋白和相应的重链（表 16-3）。在低等脊椎动物（如肺鱼）最先出现的非 IgM 的低分子量免疫球蛋白称为 IgN。其重链的分子量较 γ 链低，可能只包含三个功能区。无尾类以上出现类似 IgG 的抗体分子。真正与人 IgG 同源的抗体分子最早始见于原兽亚纲。与哺乳类 IgA 同源的抗体分子，最早见于鸟类。重链的进化可能是以 μ 链为基础，通过功能区的缺失和变异进行的(图 16-2)。IgG 各亚类，从氨基酸排列顺序和抗原性的比较看来，在进化上是较近的产物。

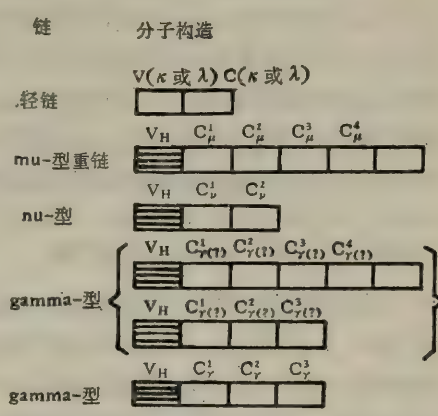


图 16-2　脊椎动物各纲免疫球蛋白肽链结构的演变。每一单位代表一个功能区（包含约 110 氨基酸残基)。(据 Marchalonis, 1977)。

4）从原始脊椎动物到人类，轻链的分子量保持恒定(约 23,000)。这提示在进化上可能存在直接的连续性。在软骨鱼类(如产婆鲨)可能已存在人 κ 链的前体，而类似 λ 型的轻链则最先出现于鸟类。

二、免疫球蛋白的类别、亚类的起源和进化——重链和轻链一级结构的比较研究

哺乳类(人和小鼠)免疫球蛋白重链和轻链一级结构的比较研究，对于阐明各类免疫

	426				430								
IgA1	Met	Val	Gly	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Leu	Ala	Phe	Thr	Gln
IgM	Val	Val	Ala	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Gln
IgG1	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
	455					460							
IgA1	Val	Glu	Met	Ala	Glu	Val	Asp	Gly	Thr	Cys	Tyr		
IgM	Leu	Val	Met	Ser	Asp	Thr	Ala	Gly	Thr	Cys	Tyr		

(据 Chuang 等，1973)。

球蛋白的起源和它们在进化上的关连以及 V 区和 C 区的进化提供了许多知识（参看第二篇有关章节）。

（一）哺乳类各类免疫球蛋白在进化上的关连

对几类免疫球蛋白的重链（γ，α，μ 链）一级结构的比较研究，已阐明各类重链的易变区（V_H）有相当高的同源性，而它们的不变区（C_H）间的同源性却很低，其链长(功能区的数目)以及低聚糖的数目也不相同（Putnam 等，1973；Low 等，1976)。这些结果支持重链是由两个基因（V 和 C 基因)决定的观点，这两个基因在进化中很早就发生分歧，各自独立地进化。免疫球蛋白的类别和亚类的分化主要是由于重链 C 区的分化所致。因此，讨论各类重链的起源以及它们在进化上的关连时，只需比较 C_H 部分。

1. IgG 和 IgM 在进化上的关连

哺乳类 IgG 和 IgM 的重链排列顺序的同源性程度相当小。根据对人 IgG1（γ1 链）和 IgM（μ 链)最大同源性的比较，发现大约只有 32% 残基相同（Putnam 等，1973）。除去顺序差异外，功能区的数目不同（μ 链有四个 C_H 功能区，γ 链只有三个），μ 链的糖含量较高，并且还存在“J”链。这些重要区别反映出 IgG 和 IgM 在脊椎动物进化过程中很早就发生异趋，并且很可能在肺鱼出现时或更早就已经发生异趋。

人 γ 和 μ 链的 C_H 区的相似程度很低，而人和家兔的 γ 链之间的同源性却相当高(约 65%)。这一事实提示，至少在哺乳类，控制 IgG 和 IgM 的 C_H 区的基因是各自独立地而相连续地平行进化的。

2. IgA 的起源

根据对人的 α，γ 和 μ 链 C 端已知 40 个氨基酸排列顺序的比较，Chuang 等（1973）认为 IgA 和 IgM 的同源性超过和 IgG 的同源性(表 16-4)，并且假定 IgA 是在 IgG 出现以后，从 IgM 演变而来的。

从表 16-4 看出，最明显的特点是 μ 链和 α 链的 C 端都要比 γ1 链多一段（包含 19 氨基酸）。α 链和 μ 链在 C 端 40 氨基酸的同源性为 55%，并且在彼此不同的 18 位置中，

C端排列顺序的比较

	440										450				
Lys	Thr	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Gly	Lys	Pro	Thr	His	Val	Asx	Val	Ser
Arg	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys	Pro	Thr	Leu	Tyr	Asx	Val	Ser
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly								

14 个位置可用单个碱基的点突变来解释。另一方面，μ 链和 γ 链的总同源性只有 32%，虽然在近 C 端处略高。

Chuang 假定 α 链(和 γ 链一样)是从 μ 链起源的，不过发生在较晚的时期。按照其他免疫球蛋白进化的大约速度估计，α 链大约起源于两亿年前。这和上述 α 链始见于鸟类的事实是一致的。

（二）人类 IgG 各亚类的进化

哺乳类 IgG 亚类的进化，在不同的种属是各自独立地进行的。人类 IgG 区分为几个亚类可能是在进化上相当晚的事情，因为对 IgG1 和 IgG4 之氨基酸排列顺序的比较，发现 90% 以上的位置是同源的。根据 IgG1 和 IgG4 之 Fc 顺序差异的数目计算，Pink (1970) 估计人类 IgG 各亚类的异趋可能发生在 20—30 × 10^6 年前，即大约相当于原始人类出现前不久的时间。

Pink 这种粗略的估计，还得到对灵长类免疫球蛋白的 Gm 同种异型标记和亚类专一抗原决定簇的研究结果的支持(参看第十五章，476 页)。

人 IgG2 亚类专一的抗原决定簇似乎在所有次人灵长类都普遍存在。然而，人IgG1，IgG3，IgG4 亚类专一的抗原决定簇，仅仅在旧大陆猴和猿类发现（Van Loghem 和 Litwin，1972）。这提示 IgG1，IgG3 和 IgG4 应起源于新大陆猴和旧大陆猴异趋的时间(约 10 × 10^6 年前)。这一结论也是和人 IgG3 特有的同种异型标记仅存在于巨猿和旧大陆猴，而不存在于新大陆猴是一致的。

（三）轻链的进化

有人曾假定在进化过程中，L 链比 H 链早出现。这种推测的主要根据是 L 链比 H 链短，只含有一个 C_L 功能区，并且假定 C_H 基因是通过 C_L 基因倍增及以后的突变起源的。排列顺序的比较分析也支持这一假说，因为 C_L 和同一物种的 C_H 各功能区之间的同源性远超过 V 区和 C 区之间的同源性。这提示如果所有的免疫球蛋白起源于一个共同的祖先基因的话，C 基因和 V 基因的异趋应发生在远早于 C_H 和 C_L 基因异趋的时

候。

从原始脊椎动物到人类，L 链的分子大小保持恒定，提示它在进化上可能保持着连续性和独立性。

1. κ 链和 λ 链的起源

人 κ 链和 λ 链之顺序同源性(约 39%)，提示它们在进化上有共同的起源。人 κ 链和小鼠 κ 链 C_L 区之间的顺序同源性(约 60%)远超过了人 κ 链和 λ 链之间的同源性(39%)或小鼠 κ 链和 λ 链之间的同源性(35%)。这提示 κ 链和 λ 链在异趋之后是各自独立进化的。各物种之间轻链顺序的相似性使有可能鉴别它是属于 κ 型或 λ 型，并追溯两型轻链的进化途径。根据现有的资料，κ 和 λ 型轻链异趋起源于何时尚不能断定。有人认为软骨鱼类(如产婆鲨)似乎已出现类似 κ 链的前体物。鳄虽然存在抗原型不同的两型轻链，但是不能鉴别它们是 κ 或 λ 型。自鸟类起才能肯定与哺乳类轻链型别的关系，如鸡的轻链属于 λ 型。

2. 两型轻链在各物种内的分布

在哺乳类和鸟类的各物种中，κ 型和 λ 型轻链的分布极为不同(图 16-3)。两型轻链的相对比例在不同的物种也有很大的变动。如啮齿类中 κ 链占优势；灵长类中κ∶λ = 2∶1；而马只有 λ 链，找不到 κ 链 (Hood 等，1967)。这种分布情况提示 λ 和 κ 基因，在不同物种是各自独立地进化的。

(四) V 区的进化

自从V和C基因在免疫球蛋白进化早期发生异趋后，它们各自是独立地而又平行地进化的。

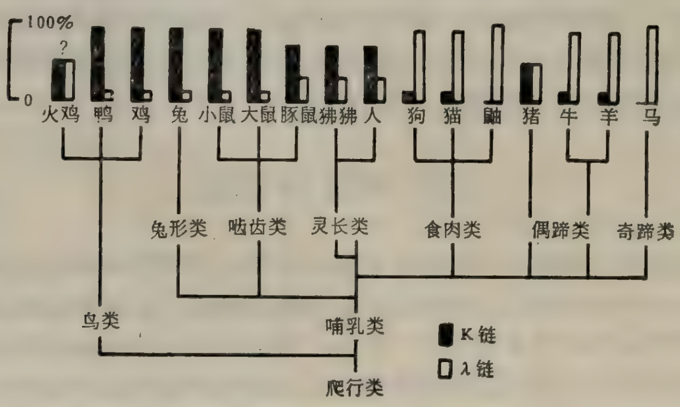


图 16-3 κ 和 λ 轻链在各物种的分布(据 Hood 等，1967)。

1. V区各亚族之间的系统发生关系

比较各类重链易变区（V_H）的排列顺序时，发现可按其顺序的最大同源性，划分为几个亚族（Subgroup），即 V_{HI}，V_{HII}，V_{HIII}（Putnam 等，1971）。如人的 IgM（ou）的μ链易变区的排列顺序与三种 IgG 之γ1 链（Cor，Daw 和 He）同属于 V_{HII} 亚族，它们之间有很高的同源性（61—75%）。反之，μ（ou）链与属于 V_{HIII} 亚族的γ1（Nie）链只有 47% 同源性；与属于 V_{HI} 的γ1（Eu）链的同源性更低，只有 31% 残基相同（参看第八章，表 8-1，231页）。这一事实表明不同类别（μ 链和 γ1 链）的重链之易变区彼此之间的相似程度大于同一类别而属于不同亚族的重链之易变区间的相似程度。κ 和 λ 轻链的易变区同样可以划分为几个亚族。κ 链的 V_L 区有四个亚族，λ 链有五个亚族。并且重链易变区（V_H）甚至和轻链易变区（V_L）也有一定程度的相似性。这些事实提示，所有编码易变区的 V 基因可能来源于共同的祖先分子，并且 V 基因和编码不变区的 C 基因（决定重链类别）是各自独立进化的。重链、κ 轻链和 λ 轻链各有一套独立进化的 V 基因。

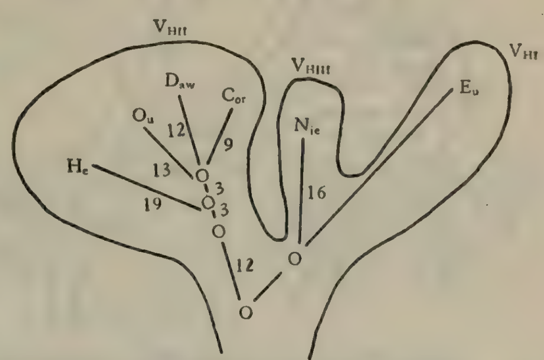


图 16-4a　人μ 和γ1 重链易变区各亚族在系统发生上的关系。据表 8-1 的数据绘制(据 Putnam等，1971)。

从重链易变区各亚族的氨基酸排列顺序异同的比较分析，还能推测重链各亚族在系统发生上的关系(图 16-4a)。此图是根据表 8-1（参看第八章，231 页）所列μ链(ou)和五种 γ1 链(Cor，Daw，He，Nie 和 Eu）之 N 端 100 氨基酸排列顺序的差异绘制的。从一共同原点起始的分枝的长度，代表从此原点开始在进化上异趋的两免疫球蛋白分子的共同祖先分子的排列顺序被置换了的氨基酸残基数目。任何两个蛋白质分子之间的分枝长度的总和，大约相当于这一对蛋白质易变区 N 端 100 氨基酸排列顺序的差异数。此差异数愈大，系统发生上的亲缘关系愈远。

同理可以绘制出κ和λ轻链 V 区各亚族的系谱树(图 16-4b)。

根据对许多物种的细胞色素 C 分子的氨基酸排列顺序的差异的分析结果绘制的系谱树图形和上图很相象。在细胞色素 C 分子的进化过程中之变异率，根据用计算机分析的结果，对于一个 140 氨基酸链长的蛋白质分子，每一个氨基酸残基的置换稳定下来所需的时间要一千万年（Fitch 和 Margoliach，1967；1970）。假定人类重链的进化是以和细胞色素 C 分子相同的突变率进行的，则μ（ou）链和γ1（Eu）链之 V_H 基因的异趋估计应发生在几亿年前。这同地质学上所知的脊椎动物各纲进化时程是不符合的。因此，推测免疫球蛋白分子重链 V 区的进化，应当以比已知蛋白质分子的突变率要高许多倍的速度来进行。

2. V_{HIII} 亚族的进化

一般说来，只有 V_{HIII} 亚族的重链有不封闭的 N 末端（Capra 等，1973），这就提

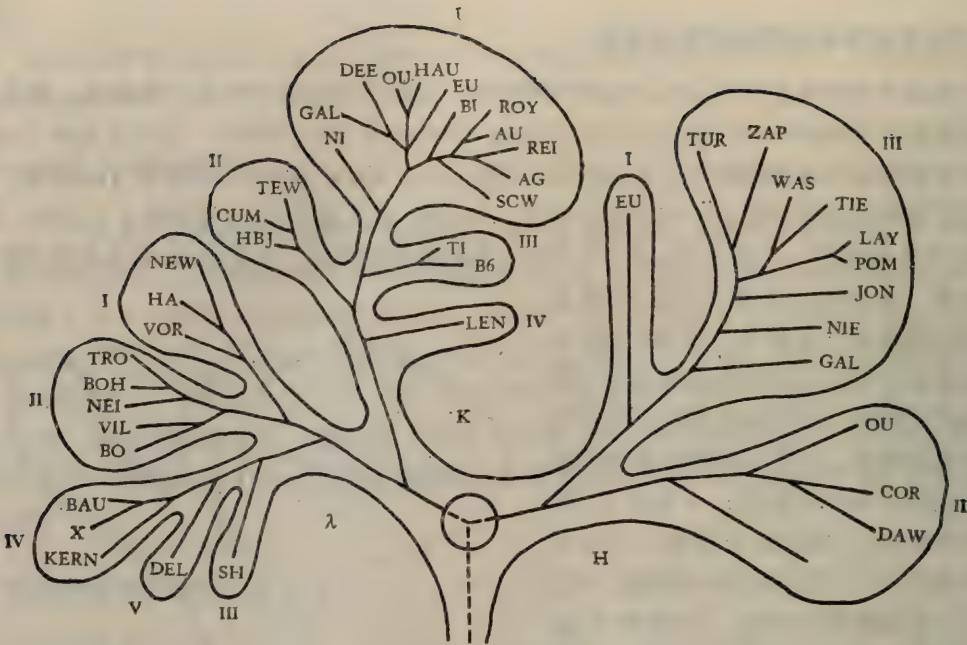


图 16-4b　κ，λ 和 H 链 V 区之系谱树，主要分枝相当于亚族，细分枝相当于个别的蛋白质(据 Hilschmann，1976)。

供了鉴别的方便。已知人类重链库中约 20％属于 V_{HIII} 亚族。根据广泛的 N 端排列顺序的比较分析，发现在许多哺乳动物，凡是具有不封闭的 N 末端的重链都和人 V_{HIII} 的排列顺序有高度的同源性。在重链库中，不封闭 N 端重链所占的比例可从 0（猪、牛、羊、山羊、马、鲸）变动到超过 95％（负鼠、狗、鼬、猫、海狮、海豹)，其他物种约为 19—29％（人、猴、大鼠、小鼠、豚鼠)。亲缘关系上邻近的物种，不封闭 V_{HIII} 链一般具有相似的比值。

最近的研究表明，重链和轻链的变异主要限于分散在几处的高变异区。V 区的其余部分(恒定骨架)的排列顺序在邻近的物种之间表现相当大的保守性（Kehoe 和 Capra，1974)。根据这些资料，有人提出一个假说认为免疫球蛋白每一条链至少是由三个基因的相互作用形成的。V 区相对恒定的骨架是由为数有限（大约相当于 V 区亚族的数目）的基因编码的，而高变异区则可能是由另一大群基因（50—100 个）编码的（Capra 和 Kindt，1975)。高变异区基因可能通过某种整合机制和编码 V 区恒定骨架的 V_H 亚族基因相互作用，形成完整的易变区。后者再通过基因移位机制和 C 基因连接起来，形成整条肽链的完整基因（Hamlyn，1976)。

在这里顺便还要再次提到 V 区多样性起源的问题。从上述可以推想，V 区的多样性可能是由在进化过程中形成的数量有限的 V 亚族基因（种质系基因）和编码高变异区的基因在胚胎发生期中相互作用的结果。按照 Kabat（1971）的假说，高变异区的肽段假定是由“染色体外基因”（“Episome”）编码的。“染色体外基因” DNA 的这一段或另一段核苷酸顺序插入重链或轻链易变区之结构基因（恒定骨架)内。假定能自身繁殖的“染色体外基因”含有大量的核苷酸排列顺序，也就是说大量的抗原结合专一性的信息。于是通过这种遗传机制就可以提供多种多样的专一性，而无需改变整个分子的基本结

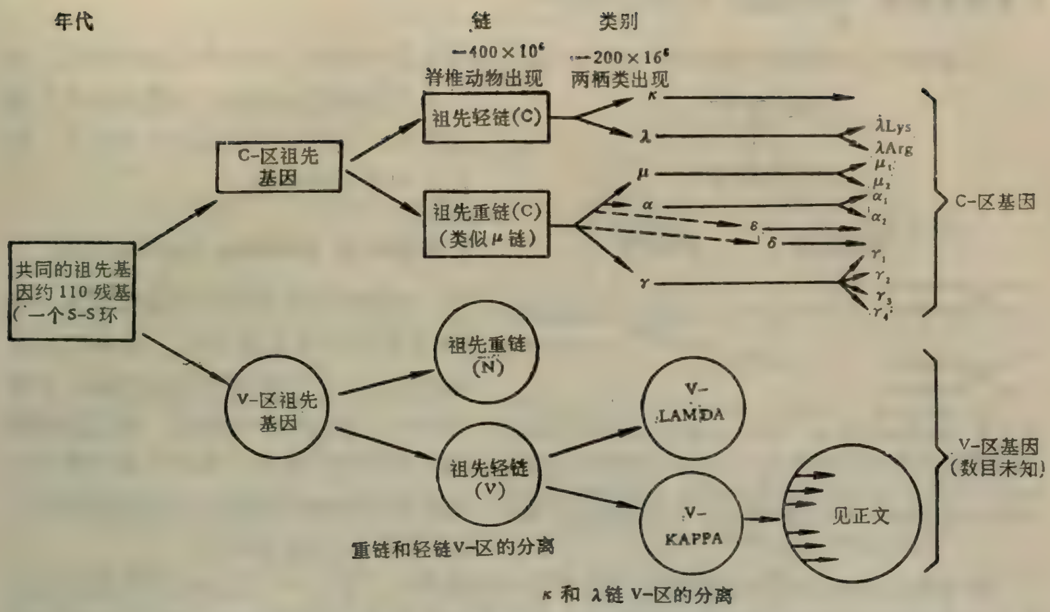


图 16-5　人免疫球蛋白分子进化途径。λ 链和重链之祖先 V-区的进化没有画出来，可能遵循和 κ 链相似的途径(据 Fudenberg, 1972)。(图中纵向倍增应为纵列倍增)

构。

最近，Kabat 等（1978）提出重链和轻链 V 区的恒定骨架，又可分为四个段（FR_1，FR_2，FR_3，FR_4）。V 区一个亚族的每一个 FR 片段是由一个“微基因”（“Microgene”）编码的。每一个 FR 片段，按排列顺序又可分为有相同顺序的几个组。胚胎发育中，重链和轻链 V 区的骨架是由这几个 FR 片段的属于不同组的微基因集合起来形成 的。上述 V 区结构多样的遗传机制的假说尚属初步臆想。还需要对生殖细胞基因组（精 子 DNA）的结构分析加以检验。

四、免疫球蛋白进化的机制

原始的免疫球蛋白出现以后，逐步演变成一大类复杂的肽链。根据系统发生和排列顺序比较研究的资料，可以设想免疫球蛋白分子进化经历三个主要的阶段(图 16-5)：

1）V 区和 C 区，重链和轻链的分化，并形成有功能的免疫球蛋白分子；

2）重链类别和轻链型别的分化；

3）各类重链的亚类、同族异型的分化。

上述每一阶段的演变可能主要是通过基因倍增和点突变的积累进行的。

（一）蛋白质分子进化的机制

根据对血红蛋白等的研究结果，蛋白质分子进化主要是通过基因倍增和点突变进行的（Arnheim，1973；Ohno，1970）。基因倍增又可能分为两种方式(图 16-6)：

1. 多倍体倍增（Polyploid duplication）

当减数分裂过程部分或全部失败时，就可能发生染色体数目或套数加倍的现象。每一个倍增的位点将有 4 个而不是 2 个基因复本。它们位于不同的染色体上，彼此之间是不连锁的。

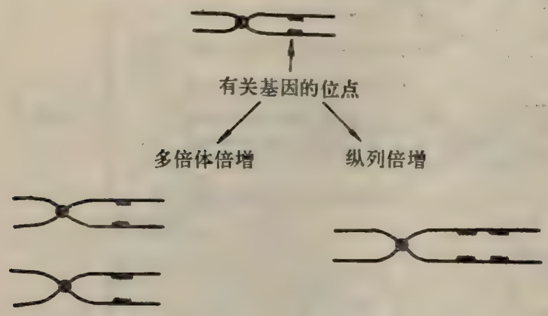


图 16-6　基因倍增的机制。多倍体倍增可能是成熟分裂部分失败的结果，导致染色体的加倍（可能包括整套染色体加倍）。由此产生的四个基因复本均为等位基因。纵列倍增可能是由于成熟分裂期中，不等交换的结果。加倍的基因位于原有基因的近旁(据 Hobart, 1975)。

2. 纵列倍增（Tadem duplication）

基因的纵列倍增包括染色体上一段 DNA 的部分或全部加倍。结果产生的基因编码的多肽链要比原来的长，或者得到一个完全加倍的基因。纵列倍增通常可能是由于成熟分裂时不等交换产生的。纵列倍增的基因位于原有基因的近旁，它们是紧密连锁的。

染色体和基因加倍的结果提供了突变和选择的机会，由此产生基因结构和功能上的分化，形成新的基因。另一方面，纵向基因倍增产生的基因重复排列，增加了非同型配对和不等交换的机会，造成遗传上的不稳定性。

由于不等交换引起的相邻的两个基因的融合(如象“Lepore”突变血红蛋白是由 β 和 δ 两个顺分子融合的结果)也可能是免疫球蛋白进化的一个重要的机制。

总之，蛋白质分子进化的机制可能通过基因倍增和点突变的积累，导致基因在结构和功能上的分化。这样产生的相邻的不同的顺反子又可能通过不等交换发生基因融合，又产生新的基因。

（二）假想的免疫球蛋白分子进化进程

1. 原始的免疫球蛋白分子的出现

在免疫球蛋白的进化中，多倍体倍增和纵列倍增都可能起作用。我们可以设想编码一个原始功能区的基因通过纵列倍增进化出一个原始的 Ig 链。其中一个基因复本特化为易变区。这一整个系统再发生两次多倍体倍增，结果在不同的染色体上产生出 κ，λ 和重链的前体基因。原始的重链 C 区基因再经过多次纵列倍增演变出各类重链（图 16-7）(Hobart, 1975)。这里应指出的，为了产生 κ，λ 和重链三个不连锁的基因群，需要两次多倍体倍增。理论上，两次多倍体倍增应产生四个独立的基因群，而实际上只有三个，还缺失一个。很有兴趣的，有证据表明和组织相容性抗原相连的 β_2 微球蛋白与免疫球蛋白的一个功能区大小相似并有一定同源性（Cunningham 等，1973）。因此，可以假设 β_2 微球蛋白就是这一个“缺失”的基因群的产物。

需要补充的，对 V_H 各亚族与 μ，γ，κ，λ 链的 C 功能区排列顺序的比较分析证明 V 和 C 区可能起源于共同的祖先基因，并且提示免疫球蛋白各功能区在进化中出现的顺序，V_H 和 C_H^1（重链 C 区的第一个功能区）可能是最古老的。此外，C_μ^2 功能区和红血

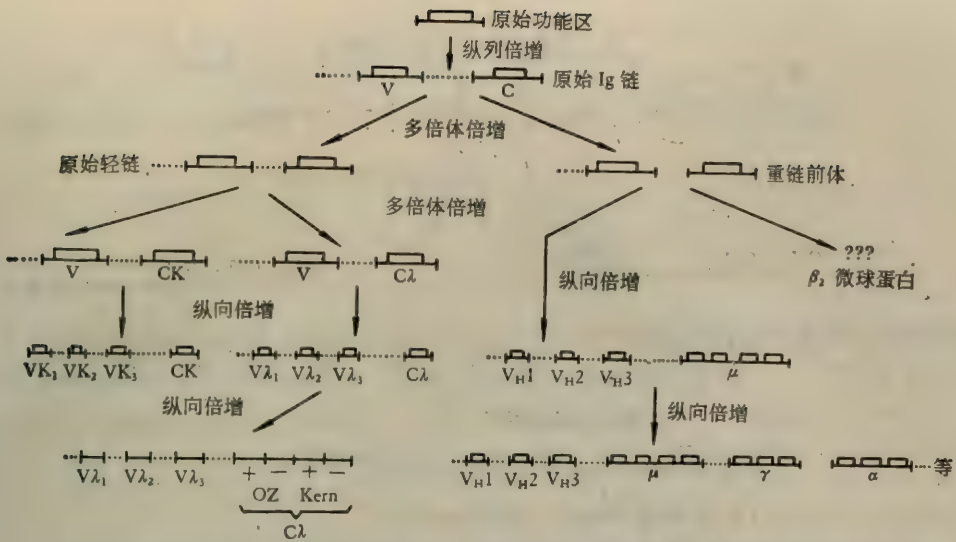


图 16-7 各类免疫球蛋白假定是由编码一个功能区的祖先基因，通过一系列的纵向倍增[1)]和多倍体倍增进化而来的。此处未表示V区的进化(图中纵向倍增应为纵列倍增)（据 Hobart, 1975)。

球膜上的 MN 血型糖蛋白 (Glycophorin) 存在颇大的同源性 (Urbain, 1972; Wuilwart 和 Urbain, 1976)。这一事实以及上述 β_2 微球蛋白与 Ig 功能区同源的事实，都提示原始的免疫球蛋白和某些膜蛋白的祖先分子可能有共同的起源。

2. 重链类别的进化

从免疫球蛋白的系统发生和一级结构的比较研究都表明，μ 链是最古老的。γ 链和 α 链都可以假定是通过不等交换机制，从原始的 μ 链失去一个功能区后，分化出来的。原始 μ 链失去 $C_\mu{}^2$功能区，衍生出 γ 链；失去 $C_\mu{}^3$功能区，衍生出 α 链(图 16-8)。ε 链则可能是通过 μ 链纵列倍增衍生出来的。

3. 重链亚类的进化

如前述纵列基因倍增是产生新基因的一个不稳定的方法。重复排列的基因的存在有利于发生不等交换，结果导致基因的缺失或融合。哺乳类中，IgG 亚类数目在不同物种有很大的变化，人类为四个亚类，豚鼠和牛有二个，家兔只有一个。这种数目变动本身显然提示 γ 链基因的数目在进化过程中波动不定。物种形成往往伴随着一些重链亚类的丧失和另一些新的亚类的产生。有清楚的证据提示，牛的 IgG 亚类是新近才进化出来的。牛的两条 γ 链亚类 C 端排列顺序与其他动物的比较见表 16-5。这两条链在 C 端 2 和 6 位置都有物种专一的残基，可认为存在共同的牛的祖先基因。牛 γ_2亚类在 10 位置有一个独特的 meth. 残基，提示这条链是从一个类似 $\gamma 1$ 链的原始的牛祖先基因通过一个点突变演变来的。因此，亚类的分化似乎象一个天然的实验，揭示了免疫球蛋白进化最近的历程。

4. 同种异型的进化机制——点突变

免疫球蛋白基因不断地经历和积累个别的突变。从根本上说，突变是导致一个免疫球

1) “纵向倍增”应为“纵列倍增”。

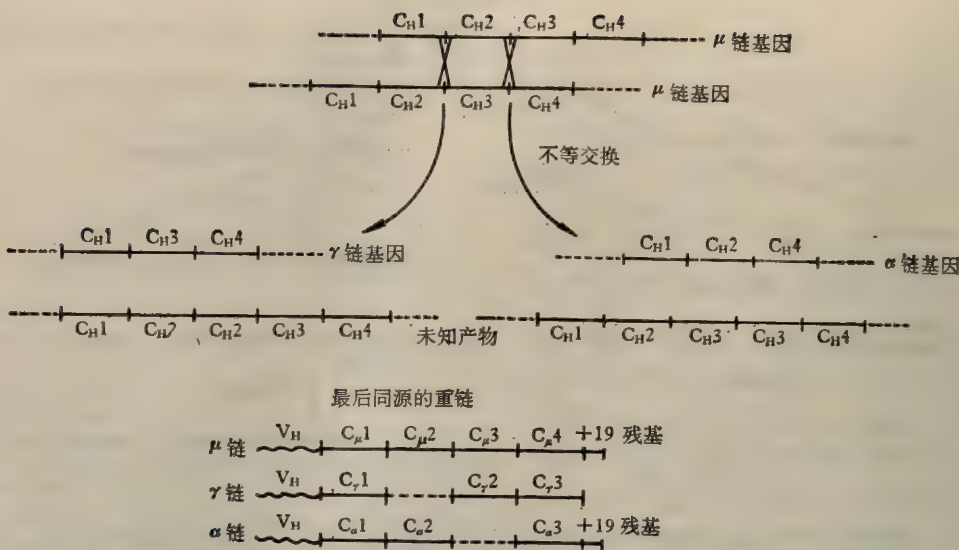


图 16-8 各类免疫球蛋白假定是由原始 μ 链的功能区缺失进化而来的 (Hobart, 1975)。

表 16-5 几种哺乳动物各亚类 γ 链 C 端排列顺序的比较

链	顺序																		
	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
人 γ1, γ2	(Met)	His-	Glu-	Ala-	Leu-	His-	Asn-	His-	Tyr-	Thr-	Gln-	Lys-	Ser-	Leu-	Ser-	Leu-	Ser-	Pro-	Gly-COOH
人 γ3Gm(−5)								Arg											
人 γ4																		Leu	
兔 γ														Ile		Arg			
马 IgG(T)γ					Val-	Glu							Asn-	Val		His			
马 IgGγ														Val		Lys			
牛 γ1														Thr		Lys		Ala	
牛 γ2										Met				Thr		Lys		Ala	

除指明的位置外,所有的顺序都和人 γ1 相同。
(据 Milstein 和 Feinstein, 1968)。

蛋白亚类的多型现象的原因, 如 Gm^f-Gm^z, Inv^1-Inv^3 的转变均可用单个的点突变来解释。其次，某些亚类或亚型的变异，如 Oz^+-Oz^-，也可能用单个点突变来解释（参看第十五章，474 页）。因此，不只是同种异型标记，而且导致亚类异趋的遗传事件也是从点突变起始的。

很有趣的是，旧大陆猴的重链存在一个专一的肽段(称为 OWM 肽段)，其排列顺序介于人类 IgG 的 Gm(a) 和 Gm(non-a) 专一的决定簇之间：

按人γ1链的顺序位置：	356	357	358	359	360
Gm(a)肽段：	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
OWM 肽段：	<u>Glu</u>	Glu	Leu	Thr	Lys
Gm (non-a)肽段：	<u>Glu</u>	Glu	<u>Met</u>	Thr	Lys

比较这三个肽段，可见 Gm (a) 和 Gm (non-a) 肽段都可能通过一步点突变起源于

OWM 肽段（Wang 等，1969）。一次突变使 OWM 肽段的 $Glu^{356}\rightarrow Asp^{356}$，从而产生 Gm（a）肽段。另一次突变使 OWM 肽段的 $Leu^{358}\rightarrow Met^{358}$，从而产生 Gm（non-a）肽段。检查有关的遗传密码的变化，表明这两次突变都是一个碱基改变的结果：

Leu(CUG) → Met (AUG)

OWM 肽段 → Gm(non-a) 肽段；OWM 肽段 → Gm(a) 肽段

Glu (GAA, GAG) → Asp (GAU, GAC)

这些发现表明从 OWM 肽段产生 Gm(a) 和 Gm（non-a）肽段的突变是相当晚的进化事件，可能发生在不到两千万年前。根据 Kunkel 实验室的工作，人 γ 链四个亚类的 C 区是受四个紧密连锁的基因编码的。γ2链，γ3链以及 Gm(a-)γ1 链都存在 Gm(non-a）肽段，并且在旧大陆猴不能发现 IgG2，IgG3 分子。这些事实提示旧大陆猴的 γ 链 C 基因在发生把 OWM 肽段转变为 Gm（non-a）肽段这一遗传事件之后，至少倍增过两次。这清楚地表明，“迅速”进行的基因倍增是免疫球蛋白 C 基进化的重要机制（Fudenberg 等，1972）。

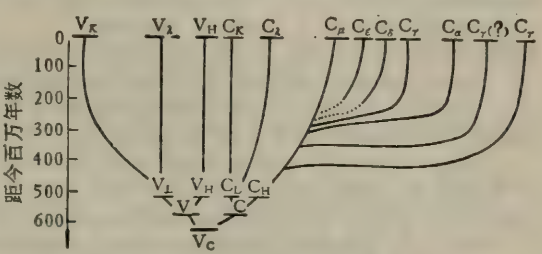


图 16-9 编码免疫球蛋白肽链顺反子进化的假想图。假定 V 基因和 C 基因起源于共同的祖先基因，并且在进化的早期就形成了在 DNA 水平连接这两个基因的机制。各类重链假定是由 C_μ 基因通过脱离倍增起源的(据 Marchalonis, 1977)。

总之，所有上述的事实表明，重链基因的进化可能通过一系列的基因倍增、重组和点突变进行的。“非对性”因子，即出现在不同亚类上的相同的抗原决定簇［如 Gm(non-a)］，可以作为证据提示亚类基因起源于倍增，并发生在进化上相当晚的时期，以致附加的突变还来不及发生使它们转化为其他亚类的同种异型标记。当研究次人灵长类更多的基因标记时，或许可能推测出人 γ 链各亚类基因的进化顺序。

总结起来，免疫球蛋白多肽链基因进化的途径可以用一个简图来表示(图 16-9)。特别要指出的，有证据提示免疫球蛋白可能是从和细胞间识别有关的膜蛋白进化而来的。最原始的免疫球蛋白可能相当于一个 V_H 区。因为，一对这样的分子位于原始淋巴细胞表面就可能构成一个专一的抗原识别单位。有关这方面的证据将在下一章讨论。

参 考 资 料

专著

Arnheim, N. (1973). The Evolution of Proteins. In: ''The Antigens'', Vol. I. p. 378, ed. by M. Sela, Academic Press.

Ayala, F. J. (1976). Molecular Evolution, Sinauer, Associates, Inc.

Fudenberg, H. H., et al. (1972). Basic Immunogenitics, Oxford University Press.

Hobart, M. J. (1975). The evolution and genetics of antibody and complement. In: ''The Immune System'', ed. by M. J. Hobart and J. McConnel, Blackwell Scientific Publications.

Marchalonis, J. J. (1977). Immunity in Evolution, Harvard University Press.

Nisonoff, A. Hopper, J. E. and Spring. S. B. (1975). The Antibody Molecule, Chap. 7, p. 264, Academic Press.

Nezlin, R. S. (1972). Structure and Biosynthesis of Antibodies, Chap. VII, p. 284, Publising House ''NAUKA'', Moskow (in Russian).

Acton, R. T., Weinheimer, P. F., Dupree, H. K. Evans, E. E. and Bennet, J. C. (1971a). Phylogeny of immunoglobulins Characterization of a 14 S immunoglobulin from the gar, Lepisosteus osseus. *Biochemistry* **10**, 2028.

Acton, R. T., Weiheimer, P. F., Dupree, H. K., Russell, T. R., Wolcott, M., Evans E. E., Schrohenloher, R E. and Bennett, J. C. (1971b). Isolation and charecterization of the immune macroglobulin from paddlefish, Polyodon spathula. *J. Biol. Chem.* **246**, 6760.

Acton, R. T., Weinheimer, P. F., Hall, S. J., Niedermeier, W., Shelton, E. and Bennett, J. C. (1971c). Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **68**, 107.

Acton, R. T., Weinheimer, P. F., Shelton, E., Niedemeier, W. and Bennett, J. C. (1972). Phylogeny of immunoglobulins—Purification and physicochemical characterization of the immune macroglobulin from the turtle, Pseudemus seripta. *Immunochemistry* **9**, 421.

Atwell, J. L. and Marchalonis, J. J. (1975). Phylogenetic emergence of immunoglobulin classes distinct from IgM. *J. Immunogentics* **1**, 367.

Bienenstock, J., Percy, D. Y. E., Gauldie, J. and Underdown, B. J. (1972). Chicken immunoglobulin resembling γ A. *J. Immunol.* **109**, 403.

Chartrand, S. L., Litman, G. W., Lapointe, N., Good, R. A. and Frommel, D. (1971). The evolution of the immune response. XII. The immunoglobulins of the turtle. Molecular requirements for biologic activity of 5.7S immunoglobulin. *J Immunol.* **107**, 1.

Chuang, C.-Y., Capra, J. D. and Kehoe J. M. (1973). Evolutionary relationship between carboxylterminal region of a human alpha chain and other immunoglobulin chain constant region. *Nature New Biol.* **244**, 158.

Clem, L. W. (1971). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. IV. Immunoglobulins of the giant grouper, Epinephelus itara *J. Biol. Chem.* **246**, 9.

Clem, L. W. and Small, P. A. (1967). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. I. Immunoglobulins of the lemon shark. *J. Exp. Med.* **125**, 893.

Clem, L. W., de Boutaud, F. and Sigel, M. M. (1967). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. II. Immunoglobulins of the nurse shark. *J. Immunol.* **99**, 1226.

Cunningham, S. A., Wang, J. L., Berggard I. and Peterson, P. A. (1973). The complete aminoacid sequence of β-2-microglobulins. *Biochemistry* **12**, 4811.

Edelman, G. M. (1970). The covalent structure of a human G-immunoglobulin. Functional implications. *Biochemistry* **9**, 3197.

Diener, E. and Marchalonis, J. J. (1970). Cellular and humoral aspects of the primary immune response of the toad, Bufo marinus. *Immunology* **18**, 279.

Fitch, W. M. and Margoliash, E. (1967). The construction of phylogenetic trees. *Science* **155**, 279.

Fitch, W. M. and Margoliash, E. (1970). The usefulness of amino acid and nucleotide sequences in evolutionary studies. *Evolu. Bio.* **4**, 67.

Frommel, E. D., Litman, G. W., Finstad, J. and Good, R. A. (1971). The evolution of the immune response. XI. The immunoglobulins of the horned shark, *Heterodontus francisci*, purification, characterization and structural requirement of antibody activity. *J. Immunol.* **106**, 1234.

Good, R. A., Finstad, J., Pollara, B. and Gabrielsen, A. E. (1966). Morphologic studies on the lymphoid tissues among the lower vertebrates. In: "Phylogeny of Immunity", ed. R. T. Smith, et al., p. 149. Gainesville: University of Florida Press.

Hamlyn, P. (1976). Igs: constant sequences in the variable region. *Nature* **259**, 80.

Hildemann, W. H. (1974). Some new concepts in immunological phylogeny. *Nature* **250**, 116.

Hood, L., Grey, W. R., Sanders, B. G. and Dreyer, W. J. (1967). Light chain evolution. *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.* **32**, 133.

Johnston, W. H. Jr., Acton, R. F., Weinheimer, P. F., Niedermeier, W., Evans, E. E. and Bennett, J. C. (1971). Isolation and physicochemical characterization of the "IgM-like" immunoglobulin from the sting ray, *Dasyatis americana. J. Immunol* **107**, 782.

Kehoe, J. M. and Capra, J. D. (1974). Phylogenetic aspects of immunoglobulin variable region diversity In: "Conteemp. Topics Mol. Immunol." Vol. 3, 143.

Kabat, E. A., Wu, T. T., and Bilofsky, H. (1978) Variable region genes for the immunoglobulin framework are assembled from small segments of DNA—a hypothesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **75**, 2429.

Klapper, D. G. and Clem, L. W. (1972). Studies on the mild reduction of shark polymeric and monomeric IgM. *Comp. Biochem. Physiol.* **42A**, 241.

Kudo, R. T., Zimmerman, B. and Grey, H. M. (1973). Phylogeny of Immunoglobulins. In: "The Antigens" Vol. I., p. 417, ed. M. Sela. Academic Press.

Low, T. L. K., Y-S-V., Liu and Putnam, F. W. (1976). Structure. function and evolutionary relationships of Fc domains of human immunoglobulin A. G. M, and E. *Science* **191**, 390.

Lebacq-Verheyden, A. M., Vaerman, J. P. and Hermans, J. F. (1972). A possible homologue of mammalian Ig A in chicken serum and secretions. *Immunology* **22**, 165.

Leslie, G. A. and Clem, L. W. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.* **130**, 1377.

Leslie, G. A. and Clem, L. W. (1972). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VI. 17S. 7.5S anti-DNP of the turtle Pseudamys scripta. *J. Immunol.* **108**, 1656.

Litman, G. W., Frommel, D., Finstad, J., Howell, J., Pollara, B. W. and Good, R. A. (1970). The evolution of the immune response. VIII. Structural studies of the lamprey immunoglobulin. *J. Immunol.* **105**, 1278.

Litman, G. W., Frommel, D., Chartrand, S. L., Finstad, T. and Cood, R. A. (1971). Significance of heavy chain mass and antigenic relationship in immunoglobulin evolution. *Immunochemistry* **8**, 345.

Marchalonis, J. J. (1969). Isolation and characterization of immunoglobulin-like proteins of the Australian lungfish (*Neoceratodus fosteri*Q *Austral. J. Exp. Med. Sci*, **47**, 405.

Marchalonis, J. J. (1970). Phylogeneticforigens of antibody structure. *Transp. Proc.* **2**, 318.

Marchalonis, J. J. and Cohen, N. (1973). Isolation and partial characterization of immunoglobulin from a urodele amphibian (*Necturus maculosis*). *Immunol.* **24**, 395.

Marchalonis, J. J. and Edelman, J. M. (1965). Phylogentic origins of antibody structure. I. Multichain structure of immunoglobulins in the smooth dogfish (*Mustelus canis*) *J. Exp. Med.* **122**, 601.

Marchalonis, J. J. and Edelman, J. M. (1966). II. Immunoglobulins in the primary immune reponse of the bull frog, *Rana catesbiana*. *J. Exp. Med.* **124**, 901.

Marchalonis, J. J. and Edelman, J. M. (1968). III. Antibodies in the primary immune response of the sea lamprey. *Petromyzon marinus*. *J. Exp. Med.* **127**, 891.

Marchalonis, J. J., Ealey, E. H. M. and Diener, E. (1969). Immune response of the tuatara, *Sphenodon punctatum*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **47**, 367.

Milstein, C. P. and Feinstein, A. (1968). Comparative studies of two types of bovine immunoglobulin G heavy-chains. *Biochem. J.* **107**, 559.

Milstein, C. P. and Pink, J. R. L. (1970). Structure and evolution of immunoglobulins. *Progr. Biophy.* **21**, 211.

Orlans, E. and Rose, M. E. (1972). An Ig-A like immunoglobulin in the fowl. *Immunochemistry* **9**, 833.

Pink, J. R. L., Buttery, S. H., De Vries, G. M. and Milstein, C. (1970). Human immunoglobulin subclasses. Partial amino acid sequence of the constant region of a 4 chain. *Biochem. J.* **117**, 33.

Poljak, R. J. (1975). Three-dimensional structure, function and genetic control of immunoglobulins. *Nature* **256**, 373.

Putnam, F. W. et al. (1973). Complete amino acid sequence of the mu heavy chain of a human IgM immunoglobulin. *Science* **182**, 287.

Saluk, P. H., Krauss, J. and Clem, L. W. (1970). The presence of two antigenically distinctlight chains (k and λ?) in alligator immunoglobulins *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**, 365.

Shelton, E. and Smith, M. (1970). The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin. *J. Mol. Biol.* **54** 615.

Shuster, J., Wang, A. C. and Fudenberg, H. (1970) Evolutionary dissociation of allotypes and other antigenic determinants of immunoglobulins in non-human primates. *Immunochem.* **7**, 91.

Steward. M. W., Todd, C. W., Kindt, T. J. and David, G. S. (1969). Low molecular weight mercaptoethanol-sensitive antibody in rabbits. *Immunochemistry* **6**, 649.

Suran, A. A. and Papermaster, B. W. (1967). N-terminal sequences of heavy and light chains of leopard shark immunoglobulins: evolutionary implications. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **58**, 1619.

Theones, G. H. and Hildemann, W. H. (1970). Immunological responses of pacific hagfish. II. Serum antibody production to soluble antigen. In: "Developmental Aspects of Antibody Formation and Structure", p. 711, Prague: *Czech. Acad. Sci.*

Thomas, W. R., Turner, K. J., Eadie, M. E. and Yadav,M. (1972). The immune response of the quakka (*Setonix brachyurus*). The production of a low molecular weight antibody. *Immunology* **22**,

401.
Urbain, J. (1972). On the homologous relationships between the variable and the constant parts of immunoglobulins. *Biochemical Genetics* **6**, 183.

Wang, A.-C., Shuster, J. and Fudenberg, H. H. (1969). Evolutionary origin of the Gm(a) peptide of immunoglobulins *J. Mol. Biol.* **41**, 83.

Wuilmart, C. and Urbain, J. (1976). Common origin and evolution of variable and constant regions of Igs. *J. Immunogentics* **3**, 1.

Zimmerman, B., Shalatin, N. and Grey, H. M. (1971). Structural studies on the duck 5.7S and 7.8S immunoglobulins. *Biochemistry* **10**, 482.

第十七章　补体及其它与免疫球蛋白有关分子的进化

脊椎动物普遍存在着的血清抗体虽然能专一地识别和结合外源的抗原，但它们单独并不足以对病源体产生显著的破坏。抗体的生物学效应还需要通过补体系统的放大和加强才能奏效。然而，在高等脊椎动物的防御系统中，补体不只是作为辅助抗体的效应功能起作用，而且还可能通过支路激活作为能引起炎症反应的中介因素独立地起作用。对补体进化起源的研究发现甚至在尚未出现抗体的某些无脊椎动物的血淋巴内，已经存在原始的补体支路系统。在脊椎动物随着免疫球蛋白的出现，专一的抗原识别系统和补体系统连接起来了，更大大加强了体液免疫防御系统的效能。补体系统的进化，特别是补体系统和抗体系统在进化上如何连接起来，是免疫性的进化研究的一个重要方面。

所有脊椎动物都有类似哺乳动物免疫球蛋白的血清抗体分子。除此之外，还存在一些在结构上或功能上同免疫球蛋白有关系的分子。其中一些分子在功能上能结合抗原，但在构造上并非免疫球蛋白；另一些分子并无抗体活力，但在构造上与免疫球蛋白存在一定的同源性。对这些分子的比较研究可能对了解免疫球蛋白在进化上的起源提供一些线索。

鉴于主组织相容性抗原在功能上和遗传控制上都和免疫球蛋白有密切的关系，因此主组织相容性抗原和免疫球蛋白在进化上的关联也是一个很有理论意义的问题。

一、补体系统的进化

补体系统按功能可分为三个分子群：早期成分（C1，4，2）、支路成分（包括B和D因子）和晚期成分(C3—C9)。经典的补体系统通过识别单位 C1q，r，s 和激活的抗原抗体复合物连接，从而触发一连串的反应，导致靶细胞专一的杀伤。另一方面，非专一的因子(如眼镜蛇蛇毒因子，CVF)，则可能通过对支路因子的激活，触发补体晚期成分的一系列反应，造成炎症反应和细胞非专一的损伤。目前有证据提示补体系统这三群分子很可能在动物界先是各自独立进化，然后又联合起来的。

（一）补体经典途径的系统发生

经典补体活力的测定采用溶血法。大多数脊椎动物的血清内都含有天然的抗羊红血球抗体。因此，通常只需要检查它们的新鲜血清对羊红血球有无溶血能力，以及这种溶血能力能否被56°C 加热或双价金属螯合剂（EDTA）去除，就能决定该血清是否含有经典的溶血补体系统。根据这一检验标准，发现除最原始的种类外，所有的脊椎动物，从

表 17-1 低等脊椎动物天然溶血系统(补体)的性质

种	纲	能使何种红血球溶血	最适温度	热稳定性	需要 Ca^{++}, Mg^{++}	抗体能否加强其作用	功能上存在的经典溶血成分	分离出的成分
八目鳗	圆口类	家兔RBC	4℃	相当稳定	可能需要(但非全或无)	不能	无	无
产婆鲨	板鳃类	各种RBC	25°—30℃	不稳定	需要	能(鲨和鳖抗 AB)	C1, 4, 2, 3, 9	C1
白鲟	硬鳞类	家兔RBC	4℃	不稳定	需要	能(哺乳类抗 AB)	C1, 4, 2, 3	无
几种硬骨鱼	硬骨鱼类	各种RBC	4°—28℃	不稳定	需要	不一致	C1, 4, 2, 3	无
蛙,蟾蜍,泥狗	两栖类	家兔RBC	4°—28℃	不稳定	需要	能(家兔和鳖抗 AB)	C1, 4, 2, 3	无
蛇,鳖	爬行类	人和羊RBC	15°—37℃	不稳定	需要	能(家兔和蛇抗 AB)	不清楚	无
鸡	鸟类	各种细胞	37℃	不稳定	需要	能(鸟)	可能全部成分	无

(据 Marchalonis, 1977)。

软骨鱼到哺乳类，都存在经典的补体溶血系统(表 17-1)。但是，它们的某些性质，如最适作用温度，加强溶血反应的抗体的种类等，则各有不同 (Gewurz 等，1966；Gilgi 和 Austin，1971)。很有趣的是，鸡的 IgY 不能固定哺乳动物的补体，但很容易固定鸡的补体，这提示 IgY 和哺乳类 IgG 的 Fc 性质不同，并且鸡的 C 1 q 识别能力存在种属专一性 (Rose 和 Orlans，1962)。然而，却有证据表明牛蛙的抗体 (IgM 和 IgG(?)) 都能固定豚鼠的补体 (Romano 等，1973)。这些事实似乎提示脊椎动物各纲中，补体系统的识别成分在进化上可能是独立发生的。

现存脊椎动物最原始的种类圆口类，虽然已能产生体液抗体，但是无论在量和质方面，体液免疫反应的能力都很弱。对八目鳗的研究发现血清内存在家兔红血球的天然“溶血素”，但是其性质和高等脊椎动物的补体溶血系统有明显的不同。这种溶血素是热稳定的，不被 EDTA 抑制，并且不能被用红血球事先免疫加强 (Gewurz 等，1966)。其次，从 Sephadex-G 200 凝胶过滤行为发现这种溶血素的分子量很小，也不同于经典的补体成分 (Pollara 等，1966)。因此，八目鳗并没有经典的补体溶血系统，而可能存在另一种改变了的或原始的溶血系统。这种情况很可能是同它们的免疫系统和体液免疫能力还处于很低的发展阶段相联系的。从软骨鱼以上，随着体液免疫能力的提高，与高等脊椎动物相同的经典补体溶血系统才逐步发展起来了。

目前对低等脊椎动物补体成分的分离和性质的研究还极少。近年来有人分离出产婆鲨的 C1 (Ross 和 Janson，1973)，发现其沉降常数为 19.3S，并含有三个明显的抗原成分。关于脊椎动物各纲补体成分在结构上的同源性，还是有待研究的问题。

(二) 无脊椎动物之非经典的补体溶血系统

虽然当用经典溶血方法检测时，无脊椎动物血淋巴内没有溶血活力，但是，Day 等 (1970，1972) 证实某些高等种类(海星，星虫和鲎)存在能被眼镜蛇毒因子 (CBV) 激活的溶血系统。进一步分析发现鲎和星虫内存在能和 CBV 结合的支路辅助因子和补体的晚期作用成分，而海星只存在支路辅助因子。这些事实提示无脊椎动物血淋巴内可能存在

一个原始的类似补体支路系统。这种原始的补体支路和在高等无脊椎动物已证明存在细胞免疫性结合起来，或许可能充当无脊椎动物的主要防御机制。脊椎动物的补体系统很可能是从这种原始的补体系统演变而来的。

总之，从上述两方面的初步资料，可以得出结论：

1）在系统发生上最早出现的补体成分是晚期作用成分（C3—C9）以及支路激活的辅助因子。补体作为一个非专一的血清防御系统，比免疫球蛋白可能有更古老的历史；

2）经典的补体系统是同免疫球蛋白共同起源和进化的；存在典型的免疫球蛋白的物种也存在经典的补体系统。

关于后一点需要加以补充说明。在最原始的脊椎动物，如八目鳗，虽然有类似 Ig M 的重链和轻链，但无链间二硫桥构造，不能固定补体。哺乳类有些类别的抗体（如IgA），由于结构不同也不能通过经典途径固定补体，而需要通过支路激活。

（三）补体系统和抗体在进化上的关联

补体系统，尤其是晚期作用成分，在进化上是非常古老的。它们可能同天然凝集素一起，加强无脊椎动物的吞噬活动，而起破坏病源体的作用。在圆口类已有原始的抗体和补体的晚期作用成分（C9）出现，可能代表一个过渡状态。可以设想在脊椎动物进化中，更古老的补体系统和较新出现的免疫球蛋白之间从软骨鱼类开始出现构造和功能上的联系。这一联系的环节是出现补体的早期作用成分（C1，4，2）。这要求产生一些新的基因，能编码既能识别 Ig，又能和 C3—C9 补体成分相互作用的蛋白分子。近来，有人发现 B 因子，C2 和 C4 在遗传上是同主组织相容性基因复合物（MHC）连锁的，并且是由位于 MHC 区域内的基因编码的（Fu 等，1974；Hobart，1977）。这些发现在补体进化上的意义需要进一步的研究，也许将有助于了解补体早期成分的起源。

二、同免疫球蛋白有关分子在进化上的关系

（一）非免疫球蛋白的“抗体”

除去具有免疫球蛋白典型肽链构造的抗体外，许多脊椎动物，从八目鳗到人，血清内常存在对常见抗原有相当强的结合能力的分子（表 17-2）。例如鳗（*Anguilla rostrata*）的所谓“抗体”是一种天然的血清蛋白，能和人类的 H(O) 血型抗原选择地结合。其物理性质和硬骨鱼的 IgM 显然不同，前者的分子量为 123,000，并且是由分子量为 40,000 的亚基非共价结合的（Bezkorovainy 等，1971）。产婆鲨血清内天然存在的一种蛋白质，能和果聚糖选择地结合，其亲合常数为 3.7×10^4升/克分子。人类及其他哺乳动物血清中天然存在的 C-反应蛋白（C-reactive protein），在炎症急性期浓度升高。这种蛋白质能和肺炎球菌 C 多糖结合，过去曾一度误认为是一种抗体。C-反应蛋白同尿嘧啶单磷酸的亲合常数为 3×10^4升/克分子。它的分子量为 129,000，由分子量为 21,000 的亚基构成（Gotschlich 和 Edelman，1967）。这一类蛋白质在免疫性进化中的地位以及在体内的功能都还不清楚。很有趣的是，有人注意到 C-反应蛋白同无脊椎动物（鲎）的天

表 17-2 与免疫球蛋白结构不同的类似抗体的蛋白质

物 种	结合专一性	分 子 量	亚基分子量	亲 合 常 数
八目鳗	红血球 H(O) 抗原	320,000(9S)	75,000 N. C.	未测
产婆鲨	果聚糖	280,500(10.6S)	55,000—77,000 N. C.	3.7×10^4L/M
鳗(*Anguilla rostrata*)	红血球 H(O) 抗原	123,000(7.2S)	40,000 N. C. ($4\times10{,}000$)	未测
人 (C-反应蛋白)	肺炎球菌 C-多糖 (N-乙酰-氨基半乳糖磷酸)	129,000(7.5S)	21,500	3.0×10^4L/M (尿嘧啶-5-磷酸, 5 ℃)

N.C = 非共价结合。
(据 Marchalonis, 1977)。

然凝集素有许多相似的地方。这两种分子都能结合多糖，并且都是由分子量约为 25,000 的亚基构成的多聚体，其聚合需要 Ca 离子。根据这些线索，因此有人猜测这种急性炎症蛋白可能代表一个与免疫球蛋白不同的原始的抗原识别系统的遗迹。

（二）与免疫球蛋白结构有关的分子

正常人体或病理情况下出现的一些蛋白质在结构上同免疫球蛋白有一定关系(表17-3)。对这些蛋白质和免疫球蛋白结构上的比较研究，有可能对免疫球蛋白进化上的起源提供一些线索。

人类血清或体液内存在的 β_2-微球蛋白(简称 β_2M) 和人 $\gamma1$链，特别是 $C_\gamma3$同源区有明显的同源性(27% 残基相同)(表 17-4)。其次，β_2微球蛋白含有一个包括 57 个氨基酸残基的链内二硫环，其大小和免疫球蛋白不变区的一个二硫环相似。这些事实提示 β_2微

表 17-3 同免疫球蛋白假定有关的蛋白质分子

蛋 白 质	相 关 的 证 据
淀粉样变性蛋白	氨基酸排列顺序同轻链同源
β_2-微球蛋白	氨基酸排列顺序同 γ 链同源
触珠蛋白	氨基酸排列顺序同轻链同源
α_1-酸性糖蛋白(一种急性炎症蛋白)	氨基酸排列顺序同轻链和重链同源
C-反应蛋白(一种急性炎症蛋白)	氨基酸组成相似
组织相容性抗原	氨基酸组成相似;功能上的相关;推测有较远的共同起源

(据 Marchalonis, 1977)。

球蛋白可能相当一个游离的 Ig 功能区 (Peterson 等, 1972); 并且还有人进一步假定 β_2微球蛋白和免疫球蛋白在进化上有共同的起源 (Hobart, 1975) (参看前一章,图 16-7, 529 页)。此外，α_1-酸性糖蛋白(简称 α_1-AG) (一种急性炎症蛋白)和人 κ 轻链的前 43 氨基酸残也有相当大的同源性 (～27%) (Emura 等, 1971)。

非常有趣的，β_2微球蛋白一方面与 $\gamma1$链同源，另一方面，它也可能是 HLA 抗原的一个亚基，存在于淋巴细胞及其他组织细胞的表面(Nakamuro 等, 1973; 参看第四章,

表 17-4 β_2 微球蛋白和 IgG1(Eu)C 同源区氨基酸排列顺序的相同残基数目

	β_2	EuC_L	EuC_H1	EuC_H2	EuC_H3
β_2	—				
EuC_L	26	—			
EuC_H1	22	32	—		
EuC_H2	22	34	28	—	
EuC_H3	28	32	30	29	—

（据 Peterson 等，1972)。

表 17-5 人免疫球蛋白及假定与它们有关的蛋白分子氨基酸组成的比较

	HLA	α_1-AG	μ	γ	L	β_2M	SAF
HLA	0						
α_1-AG	84	0					
μ	63	54	0				
γ	79	106	29	0			
L	65	77	26	24	0		
β_2-M	21	95	53	97	52	0	
SAF	129	111	121	184	177	170	0

SAF = 海绵凝集因子。
（据 Marchalonis，1977)。

137 页)。这就提出了 HLA 在进化上同免疫球蛋白的关联问题。

关于组织相容性抗原一级结构的研究还刚开始，缺乏足够资料以供比较。然而，用氨基酸组成统计分析法，比较人 HLA，β_2M，α_1AG 和 Ig 肽链（μ，γ 和 L 链）的 SΔQ 值时，发现 HLA 和 β_2M 的氨基酸组成十分相似。α_1-AG 和 β_2M 的氨基酸组成虽有较大的不同，但是 SΔQ<100 的事实仍然提示它们在进化上可能有某种关联。免疫球蛋白肽链，特别是轻链、μ 链与 HLA 的差别大约是相同的（Marchalonis 和 Weltman，1971）（表 17-5）。根据上述数据绘制的系谱树表示出这几种分子在进化上的亲缘关系（图 17-1）。这个图假想 HLA，β_2M，Ig，α_1-AG 有共同的祖先基因。通过基因倍增和突变发生异趋，产生出 HLA，β_2M 一枝以及 Ig 一枝和 α_1-AG 一枝。当然从氨基酸组成比较得出的初步结论，还需要一级结构比较分析的资料加以验证。目前得到的关于 HLA 和 H-2 末端的部分顺序的资料，并不支持这些分子和 Ig 存在同源性（Howard，1976）。不过，目前还不能排除在较后的顺序出现同源性，或者在空间构象上某些相似的可能性。

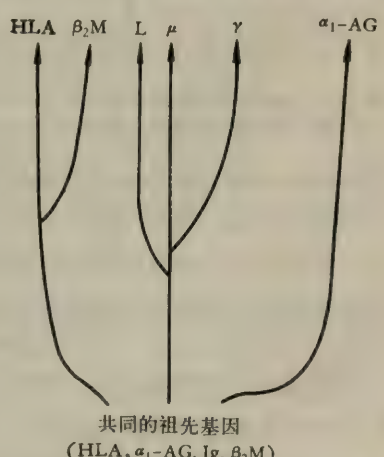


图 17-1 人免疫球蛋白与其它可能同源的蛋白质在进化上的关系图。（据 Marchalonis，1977)。

三、组织相容性抗原的进化

虽然关于主组织相容性抗原的遗传多型现象维持的原因及其生物学意义还不清楚，目前许多人主张组织相容性抗原的进化很可能是适应在发育和形态发生中细胞之间相互识别的需要而产生的（Bodmer，1972）。

人和小鼠的组织相容性抗原是由位于两个基因座的许多等位基因编码的，这些基因群称为主组织相容性基因复合物（MHC）。这一基因群又是和许多紧密连锁的基因，其中包括免疫反应基因（Ir 基因）、补体 C2，C4 和 B 因子的基因连在一起的(参看图15-27，500 页)。如第十五章所述，组织相容性抗原是和 T 细胞功能紧密相关的。在遗传上，位于 MHC 内的 Ir 基因控制着免疫活性细胞之间的相互识别和相互作用。另一方面，在个体发育和免疫活性细胞分化过程中，组织相容性抗原的遗传多型性可能作为刺激推动抗体多样性的发生（Jerne 1971；1973）。总之，组织相容性抗原和免疫球蛋白在遗传控制上和功能上都是密切相关的。因此，对 MHC 基因群进化的总图象的研究对于了解免疫识别系统的起源也是有密切关系的。

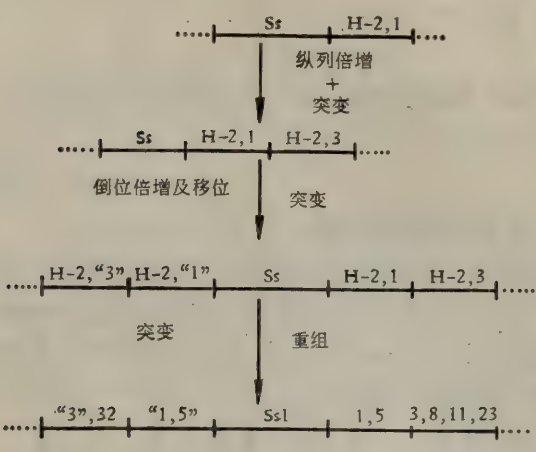


图 17-2 编码小鼠组织相容性抗原（H-2）和连锁的标记（Ss）的基因座之起源（据 Shrefler 等，1971）。

Schrefler 等（1971）根据对小鼠 H-2 遗传结构的研究，提出 H-2 基因群进化的假说。他假定 H-2 基因起先位于无关的 Ss 标记基因附近。Ss 及紧密相邻的 Slp 基因控制小鼠血清内补体的水平（Demant 等，1973）。原始的 H-2 基因发生纵列倍增，产生出两个基因复本，每一个又独立地突变。然后再发生倒位倍增和移位，结果使 Ss 标记位于两套 H-2 基因之间（图 17-2）。H-2 系统的进化在形式上与 Ig 基因的进化有些相似，都是通过基因倍增和移位进行的。近年来，对 H-2D 和 H-2K 基因产物 N 端部分顺序的分析结果表明两者之间有很大的同源性，也支持这两个基因座起源于基因倍增（Howard，1976）(参看第四章，114 页)。

总之，从这一章提供的初步资料表明一些血清蛋白或细胞表面蛋白可能与免疫球蛋白有同源性。氨基酸组成也提供免疫球蛋白和组织相容性抗原有某些相似。这些资料，以及上一章提到的 $C_\mu{}^2$ 功能区和红血球膜上的 MN 血型糖蛋白存在同源性的资料，都支持免疫球蛋白可能是从细胞间识别有关的膜蛋白进化而来的。因此，组织相容性基因复合物的结构和进化的研究，对于了解抗体及其多样性的起源有重要的理论意义。

总括起来，可以设想最原始的免疫球蛋白可能是位于原始淋巴球表面，相当于 V 区大小的一对多肽分子。它们的基因通过倍增，分化出 C_H^1 基因，并从细胞表面脱离下来，成为有结合功能的抗体分子。随着C 区基因的倍增，再分化出同固定补体、亲合细胞等效应功能有关的功能区。此后，再逐步出现重链的类别和轻链型别以及亚类的分化。免疫

球蛋白的进化过程又可能是和MHC基因群的进化密切相关地进行的。

参　考　资　料

专著

Marchalonis, J. J. (1977). Immunity in Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Smith, R. T., Miescher, P. A. and Good, R. A. (1966). Phylogeny of Immunity, University of Florida Press.

论文

Ballow, M. (1977). Phlogenetics and ontogenetics of the complement systems. In: "Comprehensive Immunology Vol. 2, Biological Amplification System in Immunology" ed. R. A. Good and S. B. Day, p. 183.

Bezkorovainy, A. Springer, G. F. and Desai, P. R. (1971). Physicochemical properties of the ell anti-human blood group H(O) antibody. *Biochmistry* **10**, 3761.

Bodmer, W. F. (1972). Evolutionary significance of the HLA system. *Nature* **237**, 139.

Day, N. K. B. Gewurz, H. Johannsen, R., Finstad, J. and Good, R. A. (1970). Complement and complemenllike activity in lower vertobrates and invertebrates. *J. Exp. Med.* **132**, 941.

Day, N. K. B., Geiger, H., Finstad, J. and Good, R. A. (1972). A starfish hemolymph factor which activates vertebrate complement in the presence of cobra venom factor. *J. Immunol.* **109**, 164

Dement, P., Capkova, J., Hinzova, E. and Voracova, B. (1973). The role of the histocompatibility-2 linked Ss-Slp region in the cortrol of mouse complement. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70** 863.

Emura, J., Ikenaka, T., Collins, J. H. and Schmid, K. (1971). The constant and variable regions of the carboxyl-terminal CNBr fragment of α_1-acid glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **246**, 7821.

Fu, S. M., Kunkel, H. G., Brusman, H. P., Allen, F. H. and Fotino, M. (1974). Evidence for linkage between HLA histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement. *J. Exp. Med.* **140**.

Gewurz, H. Finstad, J., Muschel, L. H. and Good, R. A. (1969)). Phylogenetic inquiry into the origins of the complement system. In: "Phylogeny of Immunity", ed. R. T. Smith et al., p. 105.

Gilgi, J. and Austin, K. F. (1971). Phylogeny and function of the complement system. Annu. Rev. Microbiol. 25, 309.

Gotschlich, E. C. and Edelman, G. M. (1965). C-reactive protein: a molecule composed of subunits. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **54**, 558.

Gotschlich, E. C. and Edelman, G. M. (1967). Binding properties and specificity of C-reactive protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **57**, 706.

Hobart, M. J. (1977). Complementary genetics. *Nature* **266**, 681

Howard, J. C. (1976). H-2 and HLA sequences. *Nature* **261**, 189.

Jerne, N. K. (1971). The somatic generation of immune recognition. *Europ. J. Immunol.* **1**, 1.

Jerne, N. K. (1973). The immune system. *Sci. Amer.* **229**, 52.

Marchalonis, J. J. and Weltman, J. K. (1971). Relatedness among proteins: A new method of estimation and its application to immunoglobulins. *Comp. Biochem. Physiol.* (B) **38**, 609.

Nakamuro, K., Tanigaki, N. and Pressman, D. (1973). Multiple common properties of human β_2 microglobulin and the common protein fragments derived from H2-A antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **70**, 2863.

Peterson, P. A., Cunningham, B. A., Berggard, J. and Edelman, G. M. (1972). β_2-microglobulin—a free Ig domain. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**, 1697.

Pollara, B., Finstad, J. and Good, R. A. (1966). The phylogenetic development of immunoglobulins. In: "Phylogeny of Immunity", ed. R. T. Smith, et al., p. 88.

Romano, E. L., Geczy, C. L. and Steiner, L. A. (1973). Reaction. of frog antiserum with guinea-pig complement. *Immunochemistry* **10**, 655.

Rose, M. E. and Orlans, E. (1962). Fowl antibody: III. Its haemolytic activity with complements of various species and some properties of fowl complement. *Immunol.* **5**, 633.

Ross, G. D. and Jenson, J. A. (1973). The first component (Cin) of the complement system of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). II. Purification of the first component by ultracentrifugation and studies of its physicochemical properties. *J. Immunol.* **110**, 911.

Schrefler, C. D., David, C. S., Passmore, H. C. and Klein, J. (1971). Genetic organization and evolution of the mouse H-2 region: a duplication model. *Transpl. Proc.* **3**, 176.

〔补注 1〕

Rich 实验室在 1979 年对人工合成的六核苷五磷酸（CpGpCpGpCpG）晶体作高分辨率的 X 射线衍射分析时，发现 DNA 存在一种新的、奇异的构象。天然 DNA（B-DNA）的双螺旋是右旋的，而这种新的 DNA 构象是左旋的，并且糖磷酸骨架呈现曲折的走向（zig-zag course），因此命名为 Z-DNA(Wang 等，1979)(图 1)。4*M* 浓盐溶液可以引起 DNA 构象的转化，从右旋的 B-DNA 转变成左旋的 Z-DNA。一般说来，具有嘌呤和嘧啶交替排列顺序的 DNA 都可能发生这种构象的转化。这一重要发现当时曾引起争论，有人认为这一现象是人工的，很难相信有生物学意义。

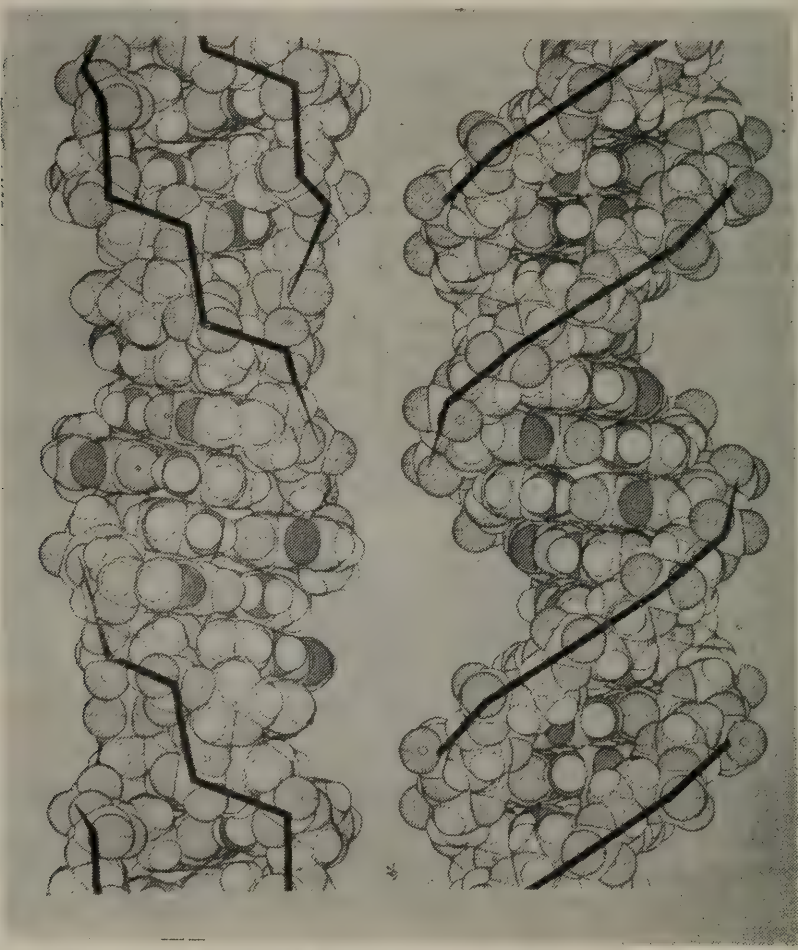


图 1　左旋 Z-DNA 和右旋的天然 DNA 之结构模型(据 Wang 等，1981)。

最近，Rich 实验室同核酸免疫学家 Stollar 合作，制备了抗 Z-DNA 构象的专一抗体。用间接萤光标记抗体法，发现抗 Z-DNA 抗体能同果蝇多线染色体的带间区域（gnter band region）专一地结合（图 2)。这一实验证实了 Z-DNA 构象在染色体上存在。由于 Z-构象是 DNA 的一种可逆的结构形

式，因此假定染色体上一定区域 DNA 构象的转化，可能同基因功能的调控有密切的关系(Nordheim 等，1981)。

参 考 资 料

Wang, A. H.-J. 等 (1979) *Nature* **282**, 680.

Wang, A. H.-J. 等 (1981) *Science* **211**, 1710.

Nordheim, A. 等 (1981) *Nature* **294**, 417.

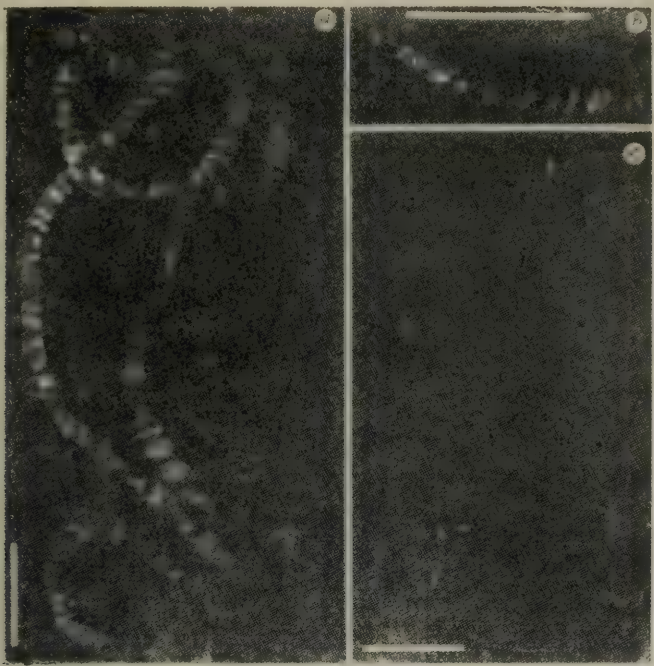


图 2 抗 Z-DNA 抗体对果蝇多线染色体之染色专一性。(a) 标准方法染色，带间区域呈现萤光；(b) 在用抗 Z-DNA 抗体染色前，染色体先经过 B-构象的 Poly (dG-dC)．Poly (dG-dC) 处理，结果染色体的染色图象没有变化；(c) 用抗 Z-DNA 抗体染色前，染色体先经过 Z-构象的溴化 Poly (dG-dC)．Poly (dG-dC) 处理，专一的萤光被抑制 (Nordheim 等，1981)。

[补注2]

最近，Nathenson 实验室报告了小鼠 H-2K^b 分子的全部一级结构 (Coligan 等，1981)，以及其他 H-2 分子的部分顺序 (Nairn 等，1980；Coligan 等，1980；Maloy 等，1981)。人类 HLA-B7 和 HLA-A2 分子的顺序测定也接近完成 (Qrr 等，1979) (图 1)。根据 H-2K^b 分子一级结构和其他性质推测主移植抗原(包括 β2M)分子的形状如图 2 所示。H-2K^b 分子全长为 346 氨基酸，主要分为三个功能区段：细胞外段 (～1—281)、膜结合段 (～282—308) 和细胞质内段 (～309—346)。分子的细胞外段又按糖基团分布和链内二硫键的同源性划分为三个大约相等的亚区 (N、CT 和 C2)。

比较 H-2K^b 同人类 HLA-B7 及其他几种小鼠和人的移植抗原的部分顺序，发现它们之间存在很高的同源性(图 1)。人和小鼠之间，氨基酸顺序约有 70% 同源，而小鼠之不同 H-2 分子之间，同源性更高，达到 75—85%。特别值得注意的，H-2 分子上氨基酸变异的位置集中在 61 和 83 位置，人类 HLA 分子也是如此。这些事实提示，移植抗原分子的这一区域可能是同种异体抗体和激活的 T 淋巴球的主要识别位置，很可能这一区域的任何一个氨基酸的突变都足以被激活的 T 细胞识别出来。

另一方面，对小鼠和人的移植抗原基因的分离和核苷酸顺序的分析也正取得顺利进展，这将大大加速对这些重要抗原的一级结构的了解 (Steinmetz 等，1981；Kvist 等，1981；Ploegh 等，1980；Sood 等，1981)。

参 考 资 料

Coligan 等 (1981) *Nature* **291**, 35.

Kvist 等 (1981) *Proc. Nat. Acad. Sci.* (U. S. A.) **78**, 2772.

Qrr 等 (1979) *Ibid* **76**, 4395.

Ploegh 等 (1980) *Ibid* **77**, 6081.

Sood 等 (1981) *Ibid* **78**, 616.

Steinmetz 等 (1981) *Cell* **24**, 125.

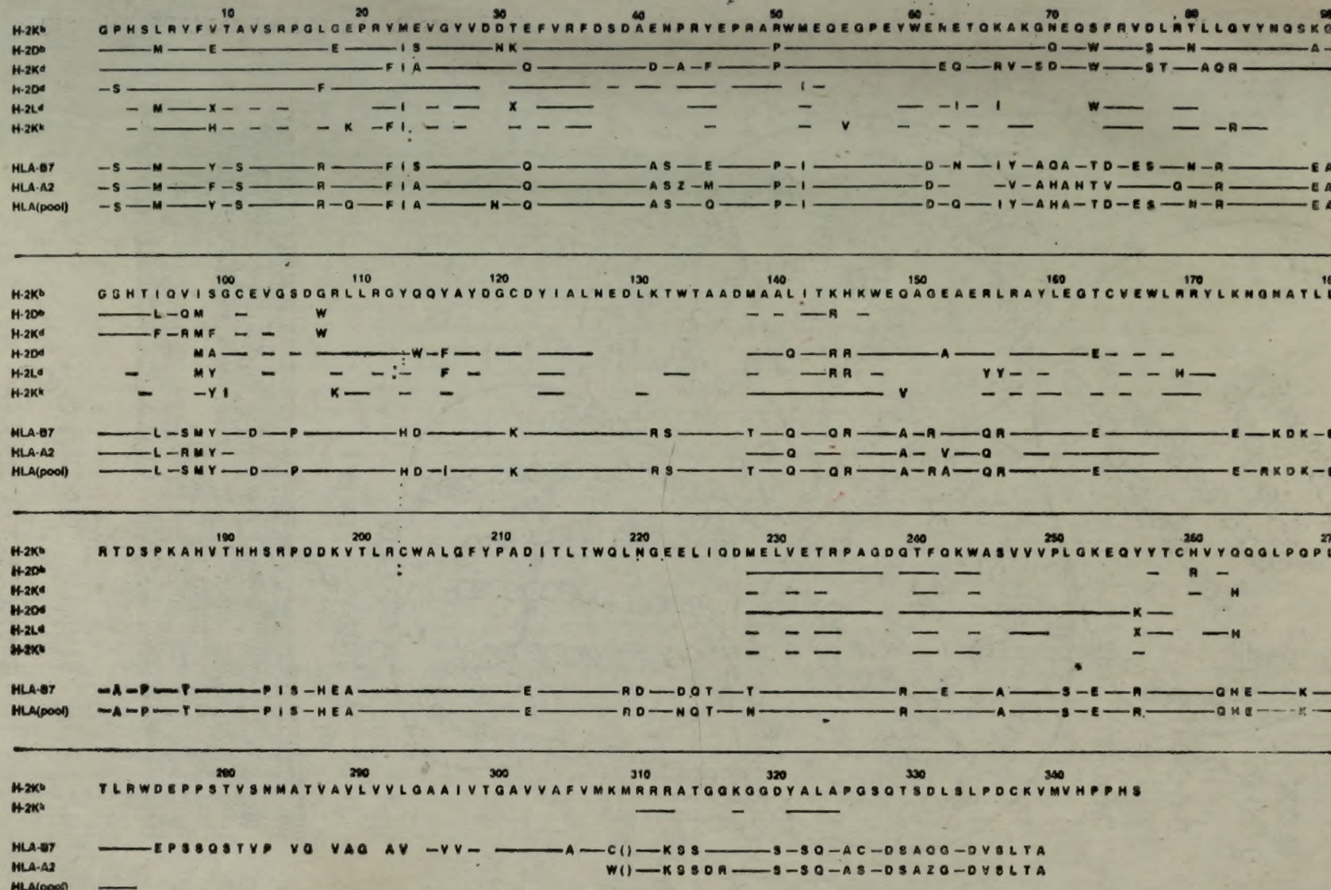


图 1 小鼠主组织相容性抗原 H-2K^{b} 分子之全部氨基酸排列顺序及与其他几种小鼠和人的有关分子的部分顺序的比较。氨基酸排列顺序用单个字母表示：A 为 Ala; C, Cys; D. Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R. Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr。CHO 为糖基团。横线表示与 H-2K^{b} 相同的顺序。括号表示 HLA 分子与 H-2K^{b} 分子之间为了得到最大同源性留出的空缺（据 Coligan 等，1981）。

中科院植物所图书馆
S0014690

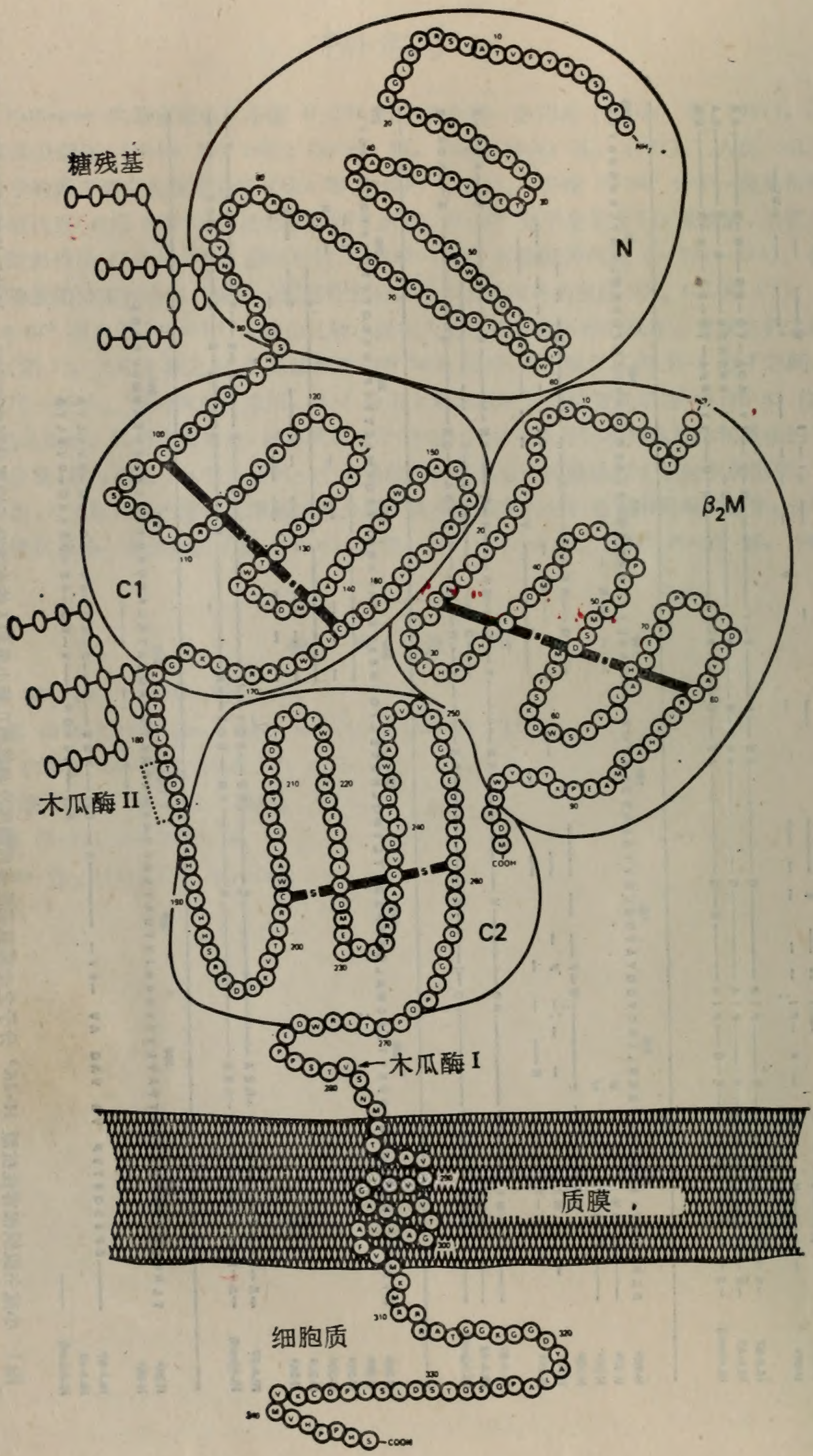


图 2　小鼠主组织相容性抗原 H-2K^b 及 β2M 之分子形状。氨基酸顺序用一个字母表示。粗黑线示链内二硫键的位置（据 Coligan 等，1981）。

收到期	85. 3. 26.
来 源	胡式之赠.
书	
单据号	
开票日期	

北京植物所

23228 58.173
分子免疫学 126
1982年

借 者	还 期	借 者	还 期
李	92.7 续93.8.20		

58.173
126
23228

统一书号：13031·20[illegible]

定　　价：　5.40 元

本社书号：2837·13-10

科技新书目：36-40